



Marta Barreto Borges

Licenciada em Análises Clínicas e de Saúde Pública

**Avaliação do efeito da simulação *in vitro* da digestão
gastrointestinal nas propriedades antioxidantes das
infusões de cidreira e tília**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes
Vogais: Prof. Doutora Maria Helena Maria Borba Alves dos Santos
Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

[Setembro 2012]



Marta Barreto Borges

Licenciada em Análises Clínicas e de Saúde Pública

Avaliação do efeito da simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal nas propriedades antioxidantes das infusões de cidreira e tília

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes

Vogais: Prof. Doutora Maria Helena Maria Borba Alves dos Santos
Prof. Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

[Setembro 2012]

Copyright – Marta Barreto Borges, UNL, FCT

“Avaliação do efeito da simulação in vitro da digestão gastrointestinal nas propriedades antioxidantes das infusões de cidreira e tília”, Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

À Professora Doutora Benilde Mendes, coordenadora deste Mestrado, por ter proporcionado todas as condições para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Paula Duarte pela excelente orientação científica, dedicação, apoio e total disponibilidade que demonstrou ao longo da realização do presente trabalho.

À minha colega Raquel Fernandes por toda a ajuda, colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Aos meus pais Maria Emília Borges e António Borges por todo o apoio, força, disponibilidade, amor e por terem sempre acreditado em mim.

Ao Francisco Borges e André Cruz pelo apoio, dedicação e amor.

A todos os meus amigos, especialmente a Sara Ferreira e Madalena Morgado pela sua presença amiga, encorajadora, pelos bons momentos passados e pelo excelente apoio moral.

Resumo

Diversos trabalhos têm vindo a demonstrar, através de ensaios *in vitro*, que as infusões de plantas medicinais possuem elevado potencial antioxidante. Contudo para que esse potencial se mantenha nas condições fisiológicas é necessário, entre outras condições, que os compostos por ele responsáveis resistam à digestão gastrointestinal. O objectivo deste trabalho foi estudar o efeito da simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal na composição em fenóis e flavonóides totais, bem como na actividade antioxidante de duas infusões de consumo corrente em Portugal: cidreira e tília. A actividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios CUPRAC, quelação de Fe(II) e sequestro dos radicais hidroxilo e anião superóxido.

No caso da infusão de tília, a simulação *in vitro* da digestão, levou a uma diminuição de cerca de 23% do teor em compostos fenólicos totais, cerca de 16% do teor em flavonóides totais e cerca de 24% do valor de CUPRAC, não tendo qualquer efeito sobre o sequestro do radical anião superóxido. No caso da infusão de cidreira a simulação da digestão levou apenas à redução em cerca de 9% do valor de CUPRAC. Nos ensaios de sequestro do radical hidroxilo e de quelação de Fe(II) não foi possível tirar conclusões devido às enzimas digestivas interferirem com as técnicas analíticas.

Os resultados obtidos permitem concluir que, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, a maioria dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante das infusões de tília e de cidreira não perde a sua actividade durante o processo digestivo.

Palavras-chave: Infusão de cidreira, infusão de tília, actividade antioxidante, digestão gastrointestinal

Abstract

Several *in vitro* studies have indicated that herbal teas have compounds with high antioxidant potential. However, the maintenance of this antioxidant potential in physiological conditions, depends on certain conditions, such as the stability of the antioxidant compounds, under the gastrointestinal digestion conditions. The aim of this work was to study the effect of the *in vitro* simulation of the gastrointestinal digestion process in phenols and flavonoids content, as well as, in the antioxidant capacity of two herbal infusions particularly consumed in Portugal: lemon balm and linden. The antioxidant capacity was evaluated by CUPRAC, chelation of Fe (II) and hydroxyl and superoxide radicals scavenging capacities.

In the case of lime infusion, the *in vitro* digestion led to a decrease of about 23% of total phenolic content, of about 16% of flavonoids content, and about 24% of CUPRAC value, not having any effect on the scavenging of superoxide radical. In the case of lemon balm infusion, the *in vitro* digestion led only to a decrease of about 9% of CUPRAC value.

The results indicate that, despite the differences observed before and after the simulation of the gastrointestinal digestion, most of the compounds responsible for the antioxidant capacities of both infusions did not lose their activities during the digestive process.

Keywords: Lemon balm tea, linden tea, antioxidant capacity, *in vitro* gastrointestinal digestion

Índice de Matérias

| | |
|---|----|
| Introdução..... | 1 |
| 1. Alimentos funcionais e nutracêuticos..... | 3 |
| 1.1. Plantas Medicinais..... | 5 |
| 1.1.1. Plantas Medicinais estudadas..... | 6 |
| 1.1.1.1. Cidreira..... | 6 |
| 1.1.1.2. Tília..... | 8 |
| 1.2. Stress oxidativo e Antioxidantes..... | 9 |
| 1.2.1. Radicais livres e Espécies Reactivas de Oxigénio..... | 9 |
| 1.2.2. Antioxidantes..... | 14 |
| 1.2.2.1. Antioxidantes enzimáticos..... | 14 |
| 1.2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos..... | 15 |
| 1.3. Ingestão e Biodisponibilidade..... | 20 |
| 1.3.1. Digestão gastrointestinal..... | 22 |
| 1.3.2. Simulação <i>in vitro</i> da Digestão gastrointestinal..... | 26 |
| 2. Materiais e Métodos..... | 28 |
| 2.1. Caracterização das infusões das plantas medicinais | 28 |
| 2.1.1. Infusão de Cidreira..... | 28 |
| 2.1.2. Infusão de Tília..... | 28 |
| 2.2. Reagentes e Enzimas..... | 29 |
| 2.3. Preparação das amostras..... | 29 |
| 2.4. Simulação <i>in vitro</i> da Digestão gastrointestinal..... | 29 |
| 2.5. Determinação de fenóis totais através do método Folin-Ciocalceu..... | 30 |
| 2.6. Quantificação flavonóides totais..... | 31 |
| 2.7 Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais..... | 32 |
| 2.7.1. Determinação da actividade antioxidante através do ensaio CUPRAC..... | 32 |
| 2.7.2. Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)..... | 33 |

| | |
|---|----|
| 2.7.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pelo aumento da formação do Formazano..... | 34 |
| 2.7.4. Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose..... | 35 |
| 2.8. Análise Estatística dos dados..... | 36 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 37 |
| 3.1. Determinação de fenóis totais através do método Folin-Ciocalceu..... | 37 |
| 3.2. Quantificação flavonóides totais..... | 38 |
| 3.3. Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais... | 40 |
| 3.3.1. Determinação da actividade antioxidante através do ensaio CUPRAC..... | 40 |
| 3.3.2. Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)..... | 42 |
| 3.3.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose..... | 43 |
| 3.3.4. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pelo aumento da formação do Formazano..... | 44 |
| Conclusão..... | 47 |
| Bibliografia..... | 50 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 <i>Melissa Officinalis</i> | 6 |
| Figura 1.2 Tília..... | 8 |
| Figura 1.3 Classificação de polifenóis..... | 17 |
| Figura 1.4 Estrutura química dos flavonóides..... | 18 |
| Figura 1.5 Subclasses de flavonóides..... | 18 |
| Figura 1.6 Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos e (B) Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos..... | 19 |
| Figura 1.7 Estrutura química do ácido caféico e do ácido clorogénico..... | 19 |
| Figura 1.8 Sistema digestivo..... | 22 |
| Figura 2.1 Aspecto da Cidreira e respectiva infusão | 28 |
| Figura 2.2 Aspecto da Tília e respectiva infusão..... | 28 |
| Figura 2.3 Estrutura do (A) NBT ²⁺ e do (B) formazano..... | 34 |
| Figura 3.1 Recta de calibração do ácido gálico utilizada na determinação dos polifenóis totais..... | 37 |
| Figura 3.2 Recta de calibração da quercetina utilizada na determinação de flavonóides totais..... | 39 |
| Figura 3.3 Recta de calibração do ácido ascórbico utilizada no ensaio CUPRAC..... | 41 |
| Figura 3.4 Curva de calibração do EDTA utilizada no ensaio de determinação da quelação de Fe (II)..... | 42 |
| Figura 3.5 Efeito das infusões de (A) Cidreira não digerida, (B) Cidreira digerida, (C) Tília não digerida e (D) Tília digerida na redução do NBT induzida pelo radical anião superóxido..... | 45 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 3.1 Teor em compostos fenólicos totais das amostras em estudo..... | 37 |
| Tabela 3.2 Teor de flavonóides totais das amostras em estudo..... | 39 |
| Tabela 3.3 Resultados obtidos no ensaio CUPRAC das amostras em estudo..... | 41 |
| Tabela 3.4 Resultados da capacidade de quelação de Fe (II) das amostras em estudo..... | 43 |
| Tabela 3.5 Percentagem de inibição da degradação da desoxirribose das amostras em estudo..... | 43 |
| Tabela 3.6 Valores de IC ₅₀ (% de amostra) das diferentes amostras para a actividade de sequestro do radical anião superóxido..... | 45 |

Simbologia e Notações

Abs – Absorvância

ATP - Trifosfato de adenosina

CAT - Catalase

CUPRAC - *Cupric Reducing antioxidant capacity*

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

eq – Equivalente

FADH₂ - Dinucleotídeo de flavina e adenina na forma reduzida

G6PD - Glucose-6-fosfato desidrogenase

GP_x - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSR - Glutathione reductase

GSSG - Glutathione oxidada

GST - Glutathione S-transferase

MDA - Malondialdeído

NADH- Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NADPH- Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida

NBT²⁺ - Azul de nitrotetrazólio

PMS – Metossulfato de fenazina

RNA - Ácido ribonucleico

RNS - Espécies reativas de azoto

ROS - Espécies reativas de oxigénio

SOD - Superóxido dismutase

TBA – Ácido tiobarbitúrico

λ – Comprimento de onda

%p/v – percentagem peso/volume

Introdução

As plantas medicinais e os seus derivados (extractos, xaropes, etc.) têm sido utilizados ao longo dos anos na medicina tradicional no tratamento de diversos distúrbios, devido às suas propriedades farmacológicas e terapêuticas, que provêm dos seus constituintes químicos. Estas plantas são ainda muitas vezes utilizadas na produção de fármacos aplicados, igualmente, na medicina convencional. Assim, as plantas medicinais, podem ser encaradas como uma fonte de compostos bioactivos que apresentam efeitos benéficos para a saúde, quer na prevenção, quer no tratamento de determinadas patologias.

Normalmente, as infusões destas plantas são ricas em compostos com propriedades antioxidantes. Um antioxidante é definido como uma substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com um substrato oxidável, atrasa e inibe a oxidação desse mesmo substrato, impedindo, assim, a ocorrência de lesões oxidativas nas estruturas celulares.

As espécies reactivas de oxigénio são um produto normal do metabolismo celular aeróbio, no entanto, quando produzidas em excesso ou quando na presença de um défice de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, ou seja, quando em condições de *stress* oxidativo, podem conduzir a uma degradação dos componentes celulares, o que pode originar uma disfunção celular e, em último caso, a morte da célula ou o surgimento de determinadas patologias. Deste modo, o consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes pode desempenhar um papel importante na promoção da saúde. Com efeito, são cada vez mais as evidências científicas que sugerem, que uma alimentação rica em alimentos de origem vegetal, ou seja alimentos que apresentam, na sua generalidade, um elevado teor em antioxidantes, possa ter um impacte positivo na saúde de cada indivíduo (Carvalho *et al*, 2011; Atoui *et al*, 2005).

As plantas medicinais seleccionadas para a elaboração do presente trabalho foram a cidreira e a tília. A razão para a sua escolha prendeu-se com o facto das infusões destas plantas serem de consumo corrente em Portugal. Diversos trabalhos publicados têm vindo a demonstrar a presença, nestas infusões, de compostos com elevado potencial antioxidante. Contudo, a maioria destes estudos, baseia-se em ensaios *in vitro*, e, deste modo, levanta-se a questão de saber até que ponto é que as propriedades detectadas *in vitro* se mantêm *in vivo*. Com efeito, o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas. Para que isso aconteça é necessário que esse composto resista ao processo de digestão gastrointestinal, que seja absorvido pelas células do intestino e que não seja rapidamente inactivado, nem pelas bactérias da flora intestinal, nem pelas enzimas de biotransformação humana.

Neste contexto, o principal objectivo deste trabalho foi o de avaliar se as propriedades antioxidantes das infusões de tília e cidreira se mantinham após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. Para tal, efectuaram-se determinações do teor em compostos fenólicos totais e, mais especificamente em flavonóides, bem como determinações da actividade antioxidante nas infusões acima mencionadas, antes e após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. Na determinação da capacidade antioxidante das infusões de cidreira e tília recorreu-se a ensaios de avaliação da capacidade redutora, capacidade de sequestro de espécies reactivas de oxigénio e ainda capacidade de quelação de ferro.

1. Alimentos Funcionais e Nutraceuticos

O conceito de alimento funcional surgiu por volta dos anos oitenta, no Japão, sendo que, actualmente, este tipo de alimentos se encontra em grande expansão, devido às suas propriedades. Embora seja um conceito bastante antigo nos países asiáticos, na medida em que muitos alimentos eram consumidos com o intuito de originarem benefícios terapêuticos, apenas no início do século vinte se começou a dar importância a este tipo de alimentos no mundo ocidental. A partir da segunda metade do século vinte começaram a surgir estudos científicos que demonstravam novas perspectivas terapêuticas para este tipo de alimentos (Bento, 2008).

São considerados alimentos funcionais os alimentos que, para além do seu valor nutritivo, inerente à sua composição química, se pensa poderem fornecer diversas substâncias bioactivas, que possam afectar benéficamente determinadas funções do organismo, contribuindo, assim, para a manutenção do bem-estar e da saúde e para a redução de determinadas doenças crónicas degenerativas (Morais & Colla, 2006). As substâncias bioactivas existentes neste tipo de alimentos são essencialmente carotenóides, compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos, cumarinas e taninos), alcalóides, compostos azotados e compostos organossulfurados (Morais & Colla, 2006; Ferreira & Abreu, 2007).

Os alimentos funcionais podem ser classificados consoante a sua origem e quanto aos seus benefícios. Assim, estes alimentos podem ter uma origem animal, vegetal ou serem produzidos através da fermentação com recurso a microrganismos, enquanto que em relação aos seus benefícios, agrupam-se consoante a sua área de acção: sistema gastrointestinal; sistema cardiovascular; metabolismo de substratos; crescimento, desenvolvimento e diferenciação celular; funções fisiológicas e antioxidantes (Morais & Colla, 2006).

A procura por parte dos consumidores de produtos alimentares, capazes de promover a saúde, bem como de produtos não alimentares (isto é, dietéticos e farmacêuticos) contendo os princípios activos presentes nestes alimentos tem vindo a aumentar. Desta forma, muitos dos constituintes bioactivos presentes nos alimentos têm vindo a ser comercializados sob a forma de produtos farmacêuticos (comprimidos, cápsulas, granulados, etc.) que incorporam extractos de alimentos ou extractos de fitoquímicos aos quais as funções fisiológicas benéficas foram directa ou indirectamente atribuídas. Para designar esta nova gama de produtos, que não pode ser verdadeiramente classificada como alimento, surgiu um novo termo híbrido entre nutriente e medicamento, o termo "Nutraceutico". Os nutraceuticos são assim suplementos dietéticos que fornecem na forma de concentrados, agentes bioactivos de alimentos, numa matriz não-alimentar, e são utilizados com a finalidade de melhorar a saúde, em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas a partir de uma alimentação normal, sendo vendidos em apresentações semelhantes à dos fármacos (comprimidos, extractos, pílulas, etc.) (Espín *et al.*, 2007).

Existem várias classes de alimentos funcionais: probióticos e prebióticos, alimentos ricos em compostos organossulfurados e nitrogenados, em ácidos gordos poliinsaturados, em fibras, em vitaminas ou em compostos fenólicos.

Os probióticos são microrganismos vivos que quando incorporados na dieta beneficiam o desenvolvimento da flora microbiana do intestino, auxiliando na prevenção de infecções entéricas e gastrointestinais. Os principais microrganismos utilizados pertencem ao género *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os seus efeitos benéficos essenciais são: controlo da microflora comensal do intestino (ex: após administração de antibióticos); promoção da resistência gastrointestinal à colonização de microrganismos patogénicos; diminuição da concentração de ácido acético e láctico, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; estimulação da digestão da lactose em indivíduos intolerantes; estimulação sistema imune e aumento da absorção de vitaminas e minerais (Morais & Colla, 2006).

Quanto aos prebióticos são oligossacarídeos não digeríveis fermentáveis, que modificam a actividade e função da microflora intestinal, de forma a promover a saúde do indivíduo. As suas principais funções são o controlo de determinadas funções biológicas como, por exemplo, a absorção do cálcio, o metabolismo dos lípidos, o controlo da composição da flora comensal do intestino, podendo estar associados a uma redução do risco do desenvolvimento de cancro do cólon (Morais & Colla, 2006).

Os alimentos ricos em compostos organossulfurados e nitrogenados são, por exemplo, os alhos, cebolas, brócolos, repolhos e rabanetes. Muitos destes compostos orgânicos parecem auxiliar na prevenção do desenvolvimento do cancro através de múltiplos mecanismos que parecem incluir a actividade antioxidante, modelação da biotransformação dos cancerígenos ou estimulação da actividade das enzimas de reparação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Kris-Etherton *et al*, 2002).

Os principais ácidos gordos poliinsaturados são os da classe ómega-3 e 6, caracterizados pela presença de uma ligação dupla localizada no carbono 3 e 6, respectivamente, a partir do radical metilo (CH₃). Estes compostos encontram-se essencialmente em peixes de água fria, tais como salmão, atum, sardinha, bacalhau, etc. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a ingestão regular destes peixes tem um efeito favorável sobre os níveis de triglicérideos, pressão sanguínea, mecanismo de coagulação, ritmo cardíaco, prevenção do cancro (mama, próstata e cólon) e redução da incidência de arteriosclerose (Morais & Colla, 2006). Para além destes efeitos o consumo dos ácidos gordos poliinsaturados parece ainda ter efeitos benéficos na reprodução, no sistema imunológico, bem como no desenvolvimento pré-natal (Connor, 2000, Olson, 2003, Bandarra *et al.*, 2004). Por serem componentes estruturais das membranas celulares, os ácidos gordos ómega-3 revelam-se importantes para o desenvolvimento do cérebro, sistema nervoso e retina, pelo que o seu consumo está associado a uma melhoria do

desenvolvimento cognitivo e da função neurológica em fetos (Cohen *et al.*, 2005), bem como numa melhoria da saúde ocular (Seddon *et al.*, 2006, Sangiovanni *et al.*, 2007).

As fibras são polissacáridos não amiláceos de elevado peso molecular, que não podem ser hidrolisados pelas enzimas do intestino e, como tal, não são uma fonte de energia para o organismo, podendo, no entanto, ser fermentados por algumas bactérias. As fibras encontram-se essencialmente em vegetais, tais como grãos (arroz, soja, trigo, etc.), verduras (ex: brócolos, couve, alface, etc.) ou raízes (ex: cenoura e rabanete), sendo que os seus principais benefícios são a redução dos níveis de colesterol sanguíneo e a diminuição dos riscos de desenvolvimento de cancro, decorrentes de três factores: capacidade de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante o processo digestivo; redução do tempo do trânsito intestinal, promovendo uma rápida eliminação do bolo fecal, com redução do tempo de contacto do tecido intestinal com substâncias mutagénicas e cancerígenas e formação de substâncias protectoras pela fermentação bacteriana dos compostos presentes nos alimentos (Morais & Colla, 2006).

Quanto aos antioxidantes serão abordados posteriormente.

1.1. Plantas Medicinais

A medicina tradicional consiste num conjunto de práticas e conhecimentos assentes em teorias, crenças e experiências indígenas, de diversas culturas, que visam promover a saúde através da prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de determinadas patologias físicas e mentais. Este tipo de medicina está ainda muito presente nos países em vias de desenvolvimento, cujo tratamento primário ainda é, em grande parte, feito à base de plantas medicinais. Contudo, nos países desenvolvidos tem vindo a notar-se um interesse cada vez maior nas terapias naturais, entre as quais se encontram as que recorrem às plantas medicinais (Benzie & Wachtel, 2011).

As plantas medicinais podem ser processadas e administradas de diversas formas, tais como, por exemplo, xaropes, infusões, óleos essenciais, pomadas, bálsamos, comprimidos ou cápsulas, sendo indicadas para ajudar a combater patologias crónicas e agudas, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, inflamações ou problemas gástricos. Estas plantas são ricas em vários compostos, tais como óleos essenciais, flavonóides, taninos, etc., sendo que muitos deles apresentam propriedades antioxidantes e têm vindo a ser utilizados na farmacologia, no desenvolvimento de fármacos (Benzie & Wachtel, 2011). Assim, apesar das infusões de plantas medicinais não terem um valor nutricional apreciável, estas podem constituir uma importante fonte de compostos bioactivos na dieta humana (Alarcon *et al.*, 2008). Para além das

propriedades antioxidantes, diversos estudos têm vindo a identificar, igualmente, em algumas destas infusões, propriedades antimutagénicas, antiinflamatórias, antivirais, antibacterianas e antitumorais, levando a supor que o consumo destas infusões possa, de facto, contribuir para a promoção da saúde (De Mejia *et al.*, 2010)

Cada vez mais a esperança média de vida está a aumentar e, como consequência, verifica-se um aumento da incidência de determinadas doenças crónicas associadas à idade avançada, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose, etc. Sendo assim, o cuidado com a alimentação e a prática de exercício físico, apresentam um papel determinante na manutenção da qualidade de vida e prevenção destas doenças crónicas. O envelhecimento está associado à acumulação de danos irreversíveis resultantes da interacção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) com o DNA, lípidos e outros componentes celulares como, por exemplo, as proteínas. Sendo assim, uma vez que as plantas medicinais são ricas em antioxidantes, é provável que estas possam desempenhar um papel essencial na prevenção destes mesmos danos (Benzie & Wachtel, 2011).

1.1.1 Plantas Medicinais estudadas

1.1.1.1 Cidreira (*Melissa officinalis*)

A *Melissa officinalis* ou cidreira é uma planta medicinal da família *Lamiaceae*. Esta planta apresenta cerca de um metro de altura, sendo cultivada por todo o mundo, devido às suas propriedades aromáticas (Figura 1.1). A *Melissa officinalis* é nativa da região do mediterrâneo e do oeste da Ásia, no entanto também é muito comum nos países tropicais, no norte de África e Europa central e do sul (Dastmalchi *et al*, 2008; Herodez *et al*, 2008; Carvalho *et al*, 2011).



Figura 1.1 – *Melissa officinalis* (www.plantasmedicinaisefitoterapia.com, acedido em Agosto de 2012).

Esta planta apresenta folhas semelhantes às da hortelã, enrugadas, de coloração verde escura a verde amarelado, consoante o clima e o tipo de solo, tendo um cheiro azedo e doce.

Quanto à sua flor apresenta uma coloração amarela. Normalmente o chá de cidreira é efectuado a partir das folhas da planta. Para além da sua utilização como erva para chá, a cidreira é, igualmente, utilizada para outros fins, que incluem a decoração de jardins, a atracção de abelhas para a produção de mel ou a produção de cosméticos (<http://www.umm.edu>, acedido em Agosto de 2012).

As folhas da cidreira são utilizadas na produção de chá devido às suas propriedades aromáticas, digestivas e antiespasmódicas. A planta da cidreira é ainda comumente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de patologias do sistema nervoso e gastrointestinal, sendo que os seus extractos aquosos e alcoólicos também são aplicados no tratamento da febre, má disposição derivada de tensão nervosa, hipertiroidismo, depressão, insónia moderada, epilepsia, dores de cabeça, dor de dentes, dor de ouvidos, flatulência, cólicas, náuseas, anemia, tonturas, indisposição, asma, bronquite, falência cardíaca, arritmias, psicoses, úlceras, reumatismo, entre outros (Mencherini *et al*, 2007; Dastmalchi *et al*, 2008; Herodez *et al*, 2008; Pereira *et al*, 2009; Carvalho *et al*, 2011).

Dentro dos constituintes do chá de *Melissa officinalis* já foram identificados diferentes polifenóis, especialmente flavonóides (luteolina) e ácidos fenólicos, óleos essenciais, aldeídos monoterpénoides, sesquiterpenos e taninos (Carnat *et al*, 1998; Carvalho *et al*, 2011). Dentro dos ácidos fenólicos identificados, o que se apresenta em maior quantidade é o ácido rosmarínico, seguido do ácido caféico, sendo o ácido m-coumarico o que se encontra num teor inferior (Dastmalchi *et al*, 2008). Na composição química dos óleos essenciais desta planta encontram-se o citronelal, citral, β -cariofileno, germacreno D, cimeno e citronelol. Vários estudos farmacológicos demonstraram que estes óleos essenciais têm actividades antibacterianas, antifúngicas e propriedades ansiolíticas (Carnat *et al*, 1998; Carvalho *et al*, 2011).

Diversos trabalhos têm atribuído à infusão de cidreira, ou a alguns dos seus componentes isolados, propriedades antioxidantes, antivirais, antimicrobianas, antiespasmódicas e antiproliferativas (Carnat *et al*, 1998; Mencherini *et al*, 2007). Ensaio *in vivo*, realizados em ratos mostraram que a administração prévia de extractos etanólicos preparados a partir da cidreira protegiam os animais dos efeitos mutagénicos e cancerígenos do metil-metanossulfato, não apresentando os próprios extractos actividade mutagénica e/ou cancerígena (Carvalho *et al*, 2011).

A actividade antioxidante das infusões de cidreira resulta dos compostos intrínsecos da planta, especialmente dos seus compostos fenólicos e, em particular, dos flavonóides. Com efeito, os flavonóides apresentam uma elevada capacidade de remover radicais livres naturais e sintéticos, manifestando um elevado potencial na protecção contra danos oxidativos *in vivo*, através da prevenção do *stress* oxidativo. Estes compostos apresentam ainda um elevado poder de quelação do ferro (II), o que o aumenta o seu poder antioxidante (Dastmalchi *et al*, 2008; Pereira *et al*, 2009; Carvalho *et al*, 2011).

As propriedades antiproliferativas da *Mellissa officinalis* também parecem ter origem nos flavonóides e ácidos fenólicos que a constituem, na medida que estes compostos conseguem inibir a biossíntese de proteínas em linhas celulares tumorais (Mencherini *et al*, 2007). As propriedades antivirais, demonstradas contra o vírus do herpes, derivam, essencialmente do ácido rosmarínico, enquanto que as antimicrobianas derivam, igualmente dos óleos essenciais (Carnat *et al*, 1998).

1.1.1.2 Tília (*Tília argentea*)

A tília é uma planta originária da Ásia ocidental e da zona central e sul da Europa. Esta planta é uma árvore robusta, que normalmente se desenvolve em climas frescos, e cuja altura pode atingir os noventa metros. A sua copa é ampla, repleta de ramos com folhagem densa. As suas folhas são grandes, arredondadas, assimétricas na base e de contorno finamente serrado, caindo, normalmente, no Inverno (Figura 1.2). Em relação às suas flores, estas apresentam uma coloração branca, creme ou amarelada, são aromáticas e normalmente nascem no Verão, apresentando uma fragrância doce e, ao mesmo tempo, forte. O chá de tília pode ser obtido através das folhas e flores da planta, apresentando normalmente um sabor agradável, derivado da sua composição em óleos aromáticos (<http://www.umm.edu>, acedido em Agosto de 2012).



Figura 1.2 – Tília ([www. jardimplantasmedicinais.com](http://www.jardimplantasmedicinais.com), acedido em Agosto de 2012).

A tília pertence à família *Tiliaceae* e as suas infusões têm sido utilizadas na medicina tradicional no tratamento de doenças do tracto respiratório (devido à sua acção expectorante e antiséptica), ansiedade, febre, infecções por *Influenza*, insónia, aterosclerose, pressão arterial elevada e inflamações, sendo ainda utilizadas como sedativo, tranquilizante, diurético, agente

imunomodulatório no fortalecimento do sistema imunitário e no auxílio da digestão (Yildirim *et al*, 2000; Toker *et al*, 2004; Marrassini *et al*, 2011).

Dentro dos vários compostos existentes nas folhas e flores desta planta foram já identificados diversos flavonóides (quercetina, caempferol, astragalina, hiperósido), taninos (responsáveis pelo *flavor* das suas infusões) e ácidos fenólicos derivados do ácido cafeico como o ácido clorogénico (Toker *et al*, 2004).

Diversos trabalhos atribuem ao chá de tília propriedades antioxidantes, hepatoprotectoras, antiinflamatórias e antibacterianas. A sua actividade antioxidante parece resultar do elevado teor de polifenóis, capazes de actuar como agentes redutores, dadores de hidrogénio e quelantes de metais. A actividade antioxidante dos extractos de tília caracteriza-se por ser dependente do seu modo de preparação, sendo diferente quando estes são preparados em água quente ou em etanol, bem como da sua concentração (Yildirim *et al*, 2000; Buricová & Réblová, 2008; Albayrak *et al*, 2012).

No que concerne à actividade antiinflamatória das infusões de tília, esta parece dever-se essencialmente à presença dos flavonóides quercetina e caempferol (Toker *et al*, 2004).

1.2. Stress Oxidativo e Antioxidantes

1.2.1. Radicais livres e Espécies Reactivas de Oxigénio

Os primeiros estudos que revelaram a importância dos radicais livres para os seres vivos surgiram nos anos setenta, e desde então têm-se intensificado, devido ao facto de haver uma associação entre estes compostos e o surgimento de determinadas patologias (Arias, 2005).

Um radical livre é uma espécie que apresenta um ou mais electrões desemparelhados, ou seja tem orbitais atómicas ou moleculares com apenas um electrão. Estes podem ser formados pela quebra de uma ligação covalente e consequente libertação de um electrão, processo denominado de fissão homolítica, ou em reacções de oxidação-redução, ou seja em reacções em que há cedência (ficam oxidados) ou recepção de electrões (ficam reduzidos) (Arias, 2005; Matsumoto, 2008).

Normalmente os radicais livres são espécies instáveis, muito reactivas e que, por isso, têm um tempo de semi-vida muito curto, reagindo e causando lesões em vários compostos e componentes celulares, tais como proteínas, lípidos e DNA. As lesões que causam nestes importantes componentes celulares tornam estes radicais tóxicos para o organismo e podem estar na base do aparecimento de determinadas patologias como, por exemplo, cancro,

aterosclerose, diabetes, cirrose ou as doenças neurodegenerativas (Arias, 2005; Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008).

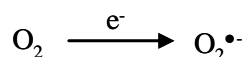
Os principais tipos de radicais livres incluem muitas das espécies reactivas derivadas do oxigénio. Estas últimas, denominam-se genericamente espécies reactivas de oxigénio (ROS), e, como o próprio nome indica, são espécies que provêm da redução do oxigénio molecular. As principais ROS que se formam *in vivo* são o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH^{\bullet}), o radical peroxilo (ROO^{\bullet}) e o oxigénio singlete (1O_2) (forma excitada do oxigénio molecular) (Ribeiro *et al.*, 2005).

As reacções de oxidação são essenciais para os organismos, o que origina a continua produção fisiológica de ROS, em diversos processos metabólicos oxidativos, como a cadeia respiratória mitocondrial ou processos que envolvam a actuação de enzimas, como, por exemplo, a xantina oxidase, ciclooxigenases, lipoxigenases ou monooxigenases, como os citocromos P450. Existem ainda vários factores exógenos que podem estimular a produção destas espécies reactivas, tais como, a exposição às radiações gama e ultravioleta, ao fumo do tabaco, a substâncias tóxicas presentes em alimentos (aditivos químicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, micotoxinas, etc.), ao elevado consumo de lípidos saturados e de determinados fármacos (Arias, 2005; Matsumoto, 2008).

A cadeia respiratória mitocondrial, ou fosforilação oxidativa é o processo a partir do qual ocorre a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), a partir da transferência de electrões do dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADH) ou do dinucleotídeo de flavina e adenina na forma reduzida ($FADH_2$) para o O_2 . A cadeia respiratória é composta por quatro complexos multiméricos (complexos I-IV), coenzima Q e citocromo c. É no complexo IV que ocorre a transferência de electrões do NADH ou $FADH_2$ para o O_2 com formação de moléculas de água, ocorrendo a formação do $O_2^{\bullet-}$ nos complexos I e III (Serafini, 2006; Al-Gubory *et al.*, 2010).

Nem todas as ROS são radicais livres, por vezes apenas são espécies que derivam do oxigénio e que podem gerar radicais livres, como é o caso do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). As espécies não radicalares podem possuir tempos de semi-vida mais prolongados, que lhes permitam difundir-se e interagir e causar danos em alvos biológicos mais afastados do seu local de produção. Por exemplo, o radical anião superóxido, apesar de ser uma espécie radicalar, possui um tempo de semi-vida suficientemente longo que lhe permite mover-se e interagir com alvos biológicos mais distantes do seu local de produção. Pelo contrário, os possíveis danos causados pelo radical hidroxilo estão mais confinados aos alvos biológicos que se encontram imediatamente adjacentes ao seu local de produção (Kohen & Nyska, 2002).

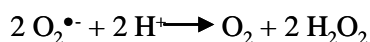
A adição de um electrão a uma molécula de oxigénio no estado fundamental origina a formação de um radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$):



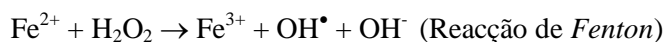
O $O_2^{\bullet-}$ é considerado uma ROS primária, na medida em que a sua formação consiste no passo inicial para a síntese e propagação de ROS secundárias. Para além de ser o precursor da maioria das ROS, por vezes também é mediador de reacções em cadeia (Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008; Al-Gubory *et al.*, 2010).

O H_2O_2 apresenta um poder oxidante indirecto, na medida em que isoladamente não é muito reactivo, no entanto é responsável pela síntese do OH^{\bullet} , o que faz com que consequentemente ocorram diversos danos celulares. Este é uma molécula estável e devido ao facto de ser relativamente apolar, atravessa a membrana celular por difusão simples podendo ir gerar o aparecimento de espécies radiculares em locais mais distantes do seu local de formação (Matsumoto, 2008; Gubory *et al.*, 2010).

O H_2O_2 é uma ROS secundária que resulta da dismutação do $O_2^{\bullet-}$, mediante a acção da enzima superóxido dismutase (SOD):



O radical hidroxilo apresenta um tempo semi-vida muito curto, sendo considerado o oxidante mais poderoso de todas as ROS, podendo causar muitos danos no organismo, na medida em que reage com todos os tipos de macromoléculas biológicas, originando produtos que não podem ser regenerados ao nível do metabolismo celular. Um exemplo disto são os danos que ocorrem ao nível das moléculas de DNA e que alteram a sua estrutura (alteração das suas bases ou quebras na dupla cadeia do DNA). Estes possíveis danos permanentes no material genético podem originar situações de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008). O OH^{\bullet} surge nas células essencialmente através da reacção de Fenton (a partir do H_2O_2), apesar de também poder ser produzido a partir do peroxinitrito, ou do radical anião superóxido (reacção de Haber-Weiss), entre outros mecanismos (Matsumoto, 2008):



Para além do Fe^{2+} outros iões metálicos, como o Cu^+ , Ti^{3+} ou Co^{2+} , podem reagir com o peróxido de hidrogénio levando ao aparecimento do radical hidroxilo, contudo, a reacção de Fenton ocorre em maior escala quando o metal de transição é o ferro (Buonocore *et al.*, 2010). Este radical é tão reactivo, que parece mais provável que os antioxidantes capazes de minimizar os danos por ele causados, não actuem directamente no seu sequestro mas sim no bloqueio da sua formação, quer através do sequestro ou inibição da formação dos seus precursores (principalmente $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2), quer pela ligação aos iões de metais de transição implicados na sua geração (Halliwell *et al.*, 1995).

O oxigénio singlete resulta da inversão de *spin* de um dos electrões desemparelhados do oxigénio molecular, que pode ocorrer através de um *input* de energia. Esta forma excitada do oxigénio molecular é altamente reactiva, podendo oxidar directamente proteínas, lípidos ou o DNA (Buonocore *et al.*, 2010).

Sabe-se que a presença de ROS resulta em ataques não só ao DNA, mas também a outros componentes celulares, tais como, ácidos gordos poliinsaturados e resíduos de fosfolípidos, que são extremamente sensíveis à oxidação. A reacção das ROS com os lípidos conduz ao desencadear dos processos de lipoperoxidação, que podem ter como consequência, alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares, o que origina a libertação de conteúdos celulares (ex: enzimas), a formação de produtos citotóxicos e a perda de selectividade na troca iónica. A perda da integridade das membranas biológicas ou a alteração da sua fluidez pode resultar na inactivação de proteínas ou de receptores membranares (Dalle-Donne *et al.*, 2006). Mais ainda, destas reacções pode resultar o aparecimento do malonildialdeído, composto que tem demonstrado possuir actividade mutagénica em bactérias e células de mamíferos e actividade cancerígena em ensaios com ratos (Valko *et al.*, 2007).

A mitocôndria, ao ser um dos principais locais de formação de ROS, constitui consequentemente, um dos principais alvos de acção destas espécies reactivas. Uma vez que a cadeia respiratória é composta por proteínas transmembranares presentes na membrana interna deste organito, a síntese de ROS ocorre perto da membrana, fazendo com que estas espécies reactivas acedam facilmente aos lípidos membranares, que são extremamente sensíveis à sua acção, devido ao facto de possuírem múltiplas ligações duplas (Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008).

A peroxidação lipídica é uma reacção que ocorre em cadeia e é dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Assim, estas reacções iniciam-se com a extracção de um átomo de hidrogénio de uma cadeia poliinsaturada de um lípido, por intermédio de uma ROS com a consequente formação de um radical lipídico (R^{\bullet}). Em células aeróbias, devido à elevada concentração de oxigénio, ocorre então, a reacção entre este e o radical de um ácido gordo, formando o radical peroxilo (ROO^{\bullet}). Segue-se então a fase de propagação, uma vez que o radical peroxilo formado é também capaz de separar átomos de hidrogénio dos ácidos gordos

adjacentes, dando assim origem a um hidroperóxido e a outro radical ácido gordo, propagando assim, a reacção de lipoperoxidação. A última fase da peroxidação, a terminação, ocorre quando o radical peroxilo reage com outro radical ou então com um antioxidante, que por ser capaz de parar este processo é caracterizado como um antioxidante capaz de quebrar reacções em cadeia (Kohen & Nyska, 2002).

A peroxidação lipídica está associada a determinadas patologias, tais como, aterosclerose, diabetes, hiperlipidemias, doenças hepáticas, cardiovasculares e neurodegenerativas (níveis elevados de produtos da lipoperoxidação) (Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008).

As proteínas constituem um dos maiores alvos para as ROS devido à sua abundância nos sistemas biológicos. Da interacção entre as ROS e estas biomoléculas pode resultar a sua quebra, a oxidação das cadeias laterais de todos os seus aminoácidos, em particular dos resíduos de cisteína e metionina, e a formação de ligações cruzadas dentro da mesma proteína ou entre proteínas diferentes, podendo todas estas alterações conduzir à perda da sua funcionalidade (Stadtman, 2004).

Os radicais livres constituídos por azoto são denominados de espécies reactivas de azoto (RNS). A principal RNS é o óxido nítrico (NO^\bullet), que é produzido nos tecidos biológicos, sendo sintetizado a partir da L-arginina mediante a acção da óxido nítrico sintase, e que apresenta propriedades fisiológicas importantes, tais como acção reguladora da morte celular programada (apoptose) ou acção neurotransmissora e vasodilatadora. No entanto, em determinadas condições o NO^\bullet participa na formação de espécies de elevada reactividade e citotoxicidade. Este composto, por ser radicalar, reage facilmente com o O_2 e com o radical anião superóxido originando o peroxinitrito (ONOO^-), que é um potente agente oxidante, podendo causar a fragmentação do DNA, desencadear a oxidação lipídica e oxidar proteínas. O ONOO^- pode circular livremente dentro e fora da célula, o que o torna mais perigoso para organismo. A mitocôndria corresponde, também, à principal fonte intracelular de NO e ONOO^- . O balanço entre o óxido nítrico e o radical anião superóxido permite definir o efeito pró-oxidante do NO^\bullet nos tecidos biológicos, na medida em que níveis elevados destes compostos podem promover a síntese do ONOO^- e, consequentemente, originar danos oxidativos nas células (Al-Gubory *et al.*, 2010).

Em condições normais, os radicais livres sintetizados em excesso são eliminados pelas defesas antioxidantes da célula, existindo, assim, um equilíbrio entre a sua síntese e a sua eliminação. Em determinadas condições, o equilíbrio acima mencionado pode ser destruído devido à produção excessiva de ROS ou a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula. Este desequilíbrio denomina-se *stress* oxidativo e pode verificar-se devido a causas naturais ou não naturais. As causas naturais podem derivar, por exemplo, do exercício físico excessivo ou de processos inflamatórios, enquanto que as não naturais se relacionam com a exposição a

determinados xenobióticos, como, por exemplo, ao fumo do tabaco ou a radiações ionizantes ou ultravioleta. Este desequilíbrio pode, igualmente, ser devido a uma depleção em antioxidantes resultante de uma nutrição deficiente (Ferreira & Abreu, 2007; Matsumoto, 2008).

1.2.2. Antioxidantes

Um antioxidante é uma substância que, quando presente em concentrações baixas em comparação com um substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse mesmo substrato. Estes compostos controlam naturalmente a formação de espécies radicalares, através da sua capacidade para as estabilizar ou inactivar, antes que estas actuem nas células, provocando danos. Sendo assim, os antioxidantes são compostos essenciais à manutenção da saúde e bem-estar (Atoui *et al*, 2005).

As defesas antioxidantes do organismo são compostas por componentes enzimáticos e moleculares, sendo classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Serafini, 2006).

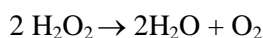
1.2.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são responsáveis pela defesa primária do organismo contra as ROS, impedindo a sua formação e interacção com alvos celulares. Estas enzimas permitem manter níveis celulares baixos de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , evitando assim a formação de OH^{\bullet} . O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído por várias enzimas, sendo as principais a SOD, catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Matsumoto, 2008).

A SOD pertencente à família das enzimas que possuem grupos prostéticos na sua constituição. Nos organismos eucariotas foram identificadas três isoformas diferentes da SOD: SOD1, SOD2 e SOD3. A SOD1 é uma proteína dimérica, que apresenta na sua composição cobre e zinco (Cu,Zn-SOD), localizando-se essencialmente no citoplasma e no núcleo. A SOD2 é uma proteína composta por manganésio (Mn-SOD) e que se encontra presente, principalmente, na mitocôndria. Quanto à SOD3 é uma glicoproteína extracelular e tetramétrica, composta por cobre e zinco (Limón-Pacheco & Gonshebbat, 2009; Al-Gubory *et al*, 2010).

A SOD é essencial na defesa do organismo contra as ROS, na medida em que constitui a primeira etapa da defesa enzimática celular, controlando os níveis de $O_2^{\bullet-}$. A SOD é assim responsável por converter este radical em H_2O_2 e O_2 , sendo o peróxido de hidrogénio produzido posteriormente convertido em água (Ferreira & Abreu, 2007; Al-Gubory *et al*, 2010).

A CAT é uma hemoproteína localizada essencialmente nos peroxissomas, apesar de também estar presente vestigialmente na mitocôndria e no retículo endoplasmático. Esta enzima é responsável pela conversão do H_2O_2 em O_2 e água (Serafini, 2006; Limón-Pacheco & Gonshebbatt, 2009):



A GPx pertence a uma família de enzimas que se divide em dois grupos: enzimas dependentes de selénio e enzimas independentes de selénio; sendo esta classificada como dependente de selénio. Esta enzima é responsável pela redução do H_2O_2 , bem como pela oxidação de outros hidroperóxidos, tais como, os hidroperóxidos lipídicos (ROOH), mediante a conversão da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) (Serafini, 2006; Limón-Pacheco & Gonshebbatt, 2009; Matsumoto, 2008; Al-Gubory *et al*, 2010):



A glutathiona redutase (GSR) é uma enzima antioxidante que catalisa a redução da GSSG a GSH, utilizando o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida na forma reduzida (NADPH) como agente redutor. Deste modo, a GSR é essencial ao ciclo de redução da glutathiona, mantendo-a em níveis adequados à manutenção do estado reduzido das células (Al-Gubory *et al*, 2010). Por sua vez, o NADPH é essencial para a actividade da GSR e para outras funções celulares importantes, sendo regenerado por acção d glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na via metabólica das pentoses fosfato (Al-Gubory *et al*, 2010).

1.2.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos provêm maioritariamente da alimentação, sendo que as frutas e os vegetais são a sua principal fonte. Estes antioxidantes são essencialmente vitaminas, oligoelementos e polifenóis (Matsumoto, 2008; Al-Gubory *et al*, 2010).

As vitaminas são essenciais ao organismo pois eliminam directamente as ROS. As principais vitaminas com acção antioxidante são a vitamina E, a vitamina C e o β -caroteno ou provitamina A.

A vitamina E é composta por quatro homólogos lipossolúveis; α -, β -, γ - e δ -tocoferóis. O homólogo mais activo e predominante é o α -tocoferol, sendo responsável pela protecção da membrana celular da oxidação por parte das ROS e radicais lipídicos, produzidos na

peroxidação lipídica. Esta vitamina está presente na membrana das lipoproteínas, bem como no fígado, rins e tecido adiposo e é o antioxidante lipossolúvel mais abundante (Serafini, 2006; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é uma vitamina antioxidante hidrossolúvel. Esta vitamina, para além de estar envolvida na desactivação directa de ROS, está, igualmente, envolvida na regeneração da forma activa da vitamina E, de flavonóides e da glutathione, de modo a que estes possam continuar a exercer as suas funções antioxidantes (Matsumoto, 2008; Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009).

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis presentes em alimentos de origem vegetal, sendo responsáveis pelas suas colorações amarela, laranja e vermelha. Os carotenóides apresentam uma cadeia de carbono com ligações duplas, que os tornam compostos com potencial antioxidante, uma vez que as suas moléculas são capazes de receber electrões de espécies reactivas, neutralizando-as. Os principais carotenóides são o β -caroteno, luteína, α -caroteno, zeaxantina, criptoxantina e licopeno. O β -caroteno é o carotenóide mais abundante nos alimentos, sendo precursor da vitamina A e um excelente quelante do oxigénio singlete (Serafini, 2006; Matsumoto, 2008; Al-Gubory *et al.*, 2010).

A glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine) é um tripeptídeo e constitui o principal antioxidante não enzimático celular. Além de ser um co-factor para actividade da GP_x, no seu estado reduzido, a glutathione, pode desactivar ROS e outras moléculas instáveis, quer por acção directa, quer através da enzima a glutathione-S-transferase (GST) (Al-Gubory *et al.*, 2010).

Os oligoelementos são muito importantes, uma vez que integram o centro activo das enzimas antioxidantes e actuam como cofactores na regulação destas mesmas enzimas, sendo assim considerados antioxidantes indirectos. Estes elementos apenas são necessários ao organismo em quantidades mínimas para um metabolismo, desenvolvimento e fisiologia normal. Os principais oligoelementos com acção antioxidante indirecta são o cobre, o zinco, o manganésio e o selénio. Este último é particularmente importante, uma vez que protege os lípidos celulares de danos oxidativos (Limón-Pacheco & Gonsébat, 2009).

Os polifenóis são metabolitos secundários de plantas, que podem estar presentes nas suas sementes, frutos, folhas, casca do caule e raiz. Estes compostos apresentam um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo. Os polifenóis englobam desde moléculas simples até moléculas com elevado grau de polimerização, apresentando assim uma estrutura muito variável. Estes compostos encontram-se em frutas frescas (citrinos, uva, cereja, ameixa, pêra, maçã e mamão), vegetais, cebola, alho, brócolos, tomate, azeite extra-virgem, chás e vinho tinto, sendo parte integral da dieta humana (Arias, 2005; Angelo & Jorge, 2007). Nos alimentos, os polifenóis podem encontrar-se sob a forma livre ou sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros.

Como antioxidantes que são, os polifenóis podem proteger as células contra os danos oxidativos e, portanto, limitar o risco de várias doenças degenerativas associadas ao *stress* oxidativo, como as doenças cardiovasculares e o cancro (Serafini, 2006). Os polifenóis presentes nos alimentos podem ajudar a limitar esses danos através de vários mecanismos: sequestrando e inativando os radicais livres, estimulando sistemas endógenos de defesa (indução de enzimas de destoxificação, como a GST, que irão reforçar a excreção de pró-oxidantes, indução de enzimas antioxidantes, inibição das enzimas responsáveis pela geração de ROS, como, por exemplo, os citocromos P450 ou as lipoxigenases, inibição da produção de radicais hidroxilo pelas reacções de Fenton e Haber-Weiss através da quelatação de iões metálicos (Ferguson, 2001).

Para além das propriedades antioxidantes, os polifenóis apresentam outras acções biológicas, tais como, antibacterianas, anticarcinogénicas, antiinflamatórias, antialérgicas, e estimulante do sistema imunitário (Atoui *et al*, 2003).

Os polifenóis podem ser classificados em diversas categorias que incluem os flavonóides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas e taninos (Figura 1.3) (Ferreira & Abreu, 2007).

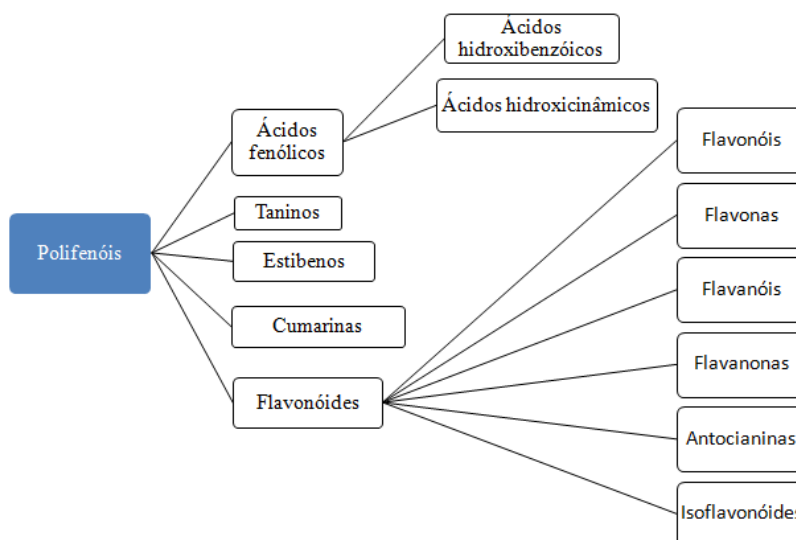


Figura 1.3 – Classificação dos polifenóis (Ferreira & Abreu, 2007)

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular, constituídos por 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆. A sua estrutura química engloba dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, ligados por três átomos de carbono, que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 1.4). O anel A provém do ciclo acetato/malonato, enquanto que o anel B é proveniente da fenilalanina. As diversas alterações no anel C padrão originam diferentes classes de flavonóides, enquanto que as alterações nos anéis A e B originam

diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides. As alterações que ocorrem nos diversos anéis aromáticos são: oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação (Angelo & Jorge, 2007).

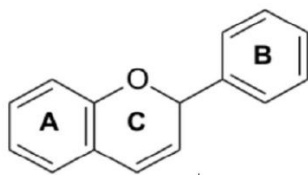


Figura 1.4 – Estrutura química dos flavonóides (Angelo & Jorge, 2007)

De acordo com a sua estrutura os flavonóides podem ser divididos em sub-grupos que incluem as flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis ou catequinas, antocianidinas e isoflavonas (Figuras 1.3 e 1.5) (Ferreira & Abreu, 2007). Nas plantas medicinais, estes compostos podem encontrar-se livres ou em formas polimerizadas com outros flavonóides (taninos condensados), com açúcares (glicosídeos de flavonóides) ou com outras substâncias.

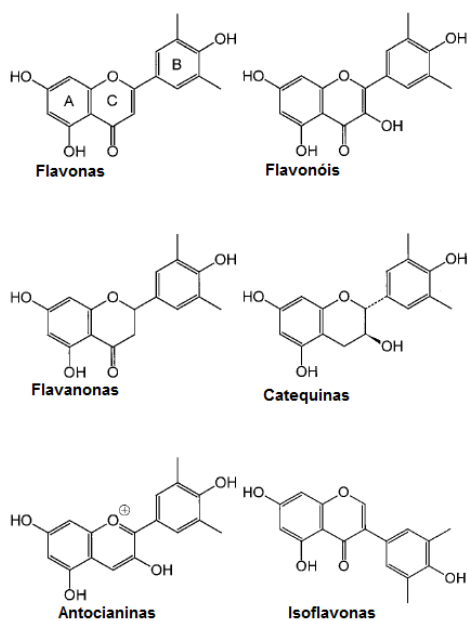


Figura 1.5 – Estrutura química das diferentes subclasses de flavonóides (Hollman & Katan, 1999)

Os alimentos ricos nas diversas subclasses de flavonóides são (Hollman & Katan (1999):

- Flavonóis - cebolas, couves, cerejas, chá e vinho tinto;
- Flavonas - salsa e tomilho;
- Flavanonas – citrinos;

- Catequinas – maçãs e chá;
- Antocianinas – cerejas e uvas;
- Isoflavonas – soja e legumes.

Os ácidos fenólicos são compostos que apresentam um anel benzênico, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo. Estes podem ser divididos em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico, que apresentam sete átomos de carbono (C_6-C_1) e os derivados do ácido hidroxicinâmico, que apresentam nove átomos de carbono (C_6-C_3) (Figura 1.6). Um exemplo dum ácido pertencente ao último grupo é o ácido cafeíco que, quando esterificado com o ácido quínico, origina o ácido clorogénico (Figura 1.7) (Matsumoto, 2008; Arias, 2005; Angelo & Jorge, 2007).

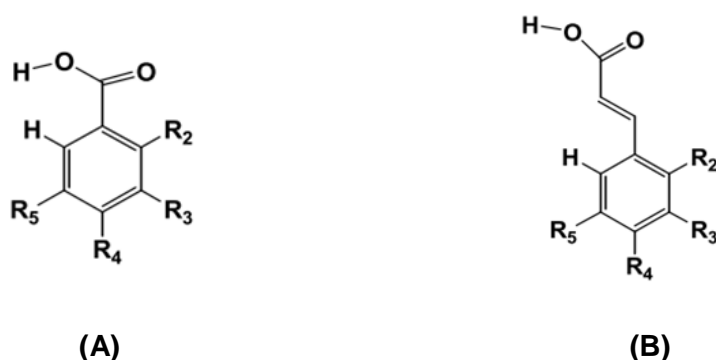


Figura 1.6 – Estrutura geral dos ácidos fenólicos: (A) Estrutura geral dos ácidos hidroxibenzóicos e (B) Estrutura geral dos ácidos hidroxicinâmicos.

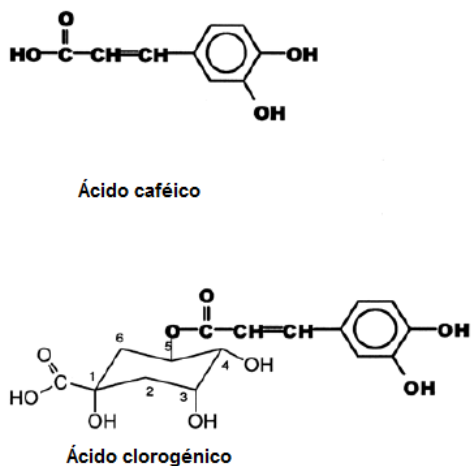


Figura 1.7 – Estrutura química do ácido cafeíco e do ácido clorogénico (Arias, 2005)

O ácido cafeíco e o ácido clorogénico apresentam elevada actividade antioxidante, na medida em que inibem a peroxidação lipídica em várias células, tais como eritrócitos e monócitos (Arias, 2005).

Os taninos são compostos com um elevado peso molecular e que são classificados em taninos hidrolisáveis e condensados. Os taninos condensados, também denominados de proantocianidinas são formados por moléculas de flavonóides, em particular de flavanóis. Assim, a unidade fundamental das proantocianidinas são as moléculas de flavanóis, e consoante o número de vezes que estas unidades se repetem, assim as proantocianidinas podem ser dímeros, trímeros, oligoméricas ou polímeros. Quanto aos taninos hidrolisáveis estes são ésteres dos ácidos gálico e elágico glicosilados, formados a partir do chiquimato. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos (Angelo & Jorge, 2007).

1.3. Ingestão e Biodisponibilidade

Quando se consome um determinado alimento, os micronutrientes e fitoquímicos nele presentes podem não ser totalmente absorvidos pelo organismo. A biodisponibilidade é um termo que avalia a percentagem destes compostos que é efectivamente absorvida, podendo, assim, ser distribuída pelos diversos tecidos e órgãos do organismo (Holst & Williamson, 2008).

Com efeito, para poderem exercer as suas actividades biológicas em tecidos e células diferentes do aparelho digestivo, os compostos bioactivos presentes nos alimentos têm de resistir ao processo de digestão gastrointestinal, ser absorvidos e não serem biotransformados, pelas enzimas de biotransformação, em metabolitos sem actividade biológica. Assim, para além de efectuar o doseamento destes compostos nos alimentos é igualmente importante determinar a proporção destes que é libertada da matriz do alimento e que fica realmente disponível para ser absorvida, ou seja a sua bioacessibilidade e a proporção que é realmente absorvida, ou seja que passa através das membranas celulares, e que fica disponível para ser utilizada pelas células, ou seja a sua biodisponibilidade. Os compostos bioactivos não absorvidos podem ainda exercer os seus efeitos benéficos ao longo do tubo digestivo, podendo, mesmo assim, contribuir para a promoção da saúde (Holst & Williamson, 2008).

Após a absorção, os nutrientes e os compostos não nutrientes são transportados a diversas partes do organismo, através de duas vias distintas. A água, iões e produtos hidrossolúveis (ex: glicose e aminoácidos) entram no sistema porta (sistema de veias portais que transporta o sangue dos intestinos, estômago, baço e pâncreas para o fígado) e são conduzidos para o fígado. Quanto aos ácidos gordos e glicerol entram nos capilares linfáticos, através dos quais são transportados até ao tecido adiposo e fígado (Seeley *et al*, 2005). Uma vez absorvidos,

os compostos não nutrientes, podem sofrer a acção das enzimas de biotransformação. Uma vez que os meios de excreção são maioritariamente aquosos, as enzimas de biotransformação têm por objectivo efectuar a metabolização dos compostos não nutrientes de modo a torná-los mais hidrofílicos e, por isso, mais facilmente excretáveis, de modo a evitar que ocorra a sua acumulação no organismo. Ao alterar as características físico-químicas dos compostos químicos, a biotransformação pode modificar as suas propriedades biológicas, tornando compostos bioactivos em metabolitos sem actividade biológica ou pode originar metabolitos bioactivos a partir de precursores sem actividade biológica. Os compostos bioactivos e/ou os seus metabolitos serão finalmente excretados por via renal, biliar ou, em alguns casos, pulmonar (Duarte, 2008).

Existem diversos factores que influenciam a biodisponibilidade dos compostos químicos, uns que estão relacionados com o composto em si, e que englobam a sua estrutura química ou o seu grau de ionização, e outros que não estão directamente relacionados com o composto em si, mas sim com factores como, a complexidade da matriz do alimento onde o composto se insere, o tipo e quantidade dos outros compostos ingeridos ou o maior ou menor tempo do esvaziamento gástrico ou de trânsito intestinal (Holst & Williamson, 2008).

Muitos dos fitoquímicos ingeridos apresentam uma baixa biodisponibilidade, especialmente quando comparados com os macronutrientes, devido ao facto de serem reconhecidos pelo organismo como compostos xenobióticos (Holst & Williamson, 2008).

A absorção digestiva dos polifenóis parece variar consoante a sua estrutura, o que faz com que nem sempre sejam os polifenóis mais abundantes nos alimentos aqueles que podem atingir maiores concentrações no interior das células humanas. O ácido gálico e as isoflavonas parecem ser os polifenóis mais bem absorvidos, seguidos pelas catequinas, flavanonas e glicosídeos de quercetina, sendo as proantocianidinas, as catequinas galato do chá e as antocianinas os polifenóis de mais difícil absorção (Manach *et al.*, 2005). A metabolização pela flora intestinal tem sido pouco estudada mas pode ter um efeito preponderante nas actividades biológicas destes compostos, uma vez que os polifenóis que não forem absorvidos no tracto gastrointestinal, podem ser metabolizados por estas bactérias, originando metabolitos passíveis de serem absorvidos no epitélio do cólon e, desta forma, chegar à corrente sanguínea. Por exemplo, as proantocianidinas têm demonstrado alguns efeitos em ensaios epidemiológicos embora se saiba que a sua absorção intestinal seja muito reduzida. Desta forma, é possível que os efeitos biológicos associados a estes compostos resultem de algum metabolito formado no decurso da sua metabolização pelas bactérias da flora intestinal (Williamson & Manach, 2005).

1.3.1. Digestão Gastrointestinal

Todas as células do organismo necessitam de ser nutridas através de compostos assimiláveis e para tal, o aparelho digestivo, em conjunto com o circulatório, proporcionam-lhes os nutrientes necessários à vida. O aparelho digestivo é formado pelo tubo digestivo (que se estende desde a boca até ao ânus) e pelas glândulas anexas (que segregam fluidos para o tubo digestivo). Sendo assim, o tubo digestivo divide-se em: boca ou cavidade oral, faringe, esófago, estômago e intestino delgado (constituído pelo duodeno, jejuno e ílio). Quanto às glândulas anexas englobam as glândulas salivares, amígdalas, glândulas tubulares, fígado, pâncreas e vesícula biliar (Figura 1.8) (Siley *et al*, 2005).

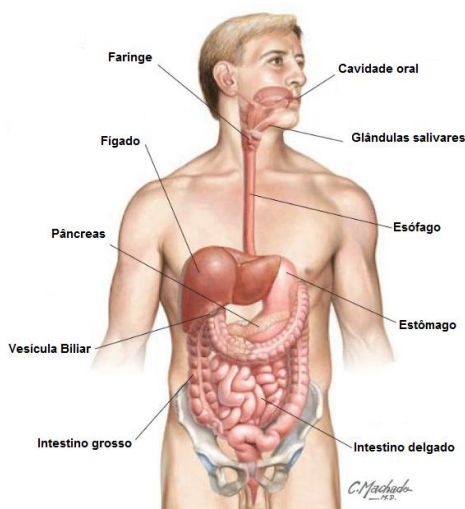


Figura 1.8 – Sistema digestivo (<http://www.dj003.k12.sd.us>, acedido em Agosto de 2012).

A digestão consiste num conjunto de transformações físico-químicas que os alimentos ingeridos sofrem, com o intuito de serem convertidos em compostos de menores dimensões e que possam ser mais facilmente absorvidos para a circulação. No entanto, nem todas as moléculas são fraccionadas antes de serem absorvidas, como é o caso das vitaminas, água e sais minerais (Seeley *et al*, 2005). A digestão inclui processos químicos e mecânicos. A digestão química é realizada pelas enzimas digestivas, secretadas em vários locais do sistema digestivo. Estas enzimas quebram as ligações covalentes das moléculas orgânicas, através de uma hidrólise enzimática, na presença de água, permitindo, assim, a transformação das referidas macromoléculas de modo a que os seus constituintes possam ser absorvidos pelas células da mucosa gastrointestinal. Quanto à digestão mecânica, envolve o fraccionamento das partículas

alimentares através da contracção muscular do tracto gastrointestinal (Gropper *et al*, 2005; Seeley *et al*, 2005; Ferrua & Singh, 2010).

A digestão inicia-se na boca, continua no estômago, e termina na porção proximal do intestino delgado, principalmente no duodeno, sendo que algumas moléculas podem ser absorvidas ao longo de todo o tubo digestivo (Seeley *et al*, 2005).

Na boca os alimentos são triturados e misturados com a saliva formando o bolo alimentar (Kohlmeier, 2003). A digestão na boca deve-se essencialmente à acção das enzimas presentes na saliva. A saliva é secretada pelas glândulas salivares parótidas, submaxilares, sublinguais, entre outras, e apresenta um pH entre 6,4 e 7,5, o que favorece a acção da amilase salivar (principal enzima presente na saliva). A principal função desta enzima é catalisar a hidrólise de polissacáridos (amido, glicogénio e seus derivados). No entanto, existem outras enzimas que são produzidas em menores quantidades, como é o caso da maltase e da catalase. Quando os alimentos são inseridos na cavidade oral, existem reflexos nervosos que estimulam a secreção de saliva, sendo este fenómeno controlado pelo sistema nervoso autónomo (Gropper *et al*, 2005).

Da boca o bolo alimentar progride através do esófago para o estômago, onde ocorre a sua mistura com o suco gástrico, secretado pelas glândulas presentes nas paredes do estômago. O suco gástrico é composto por água, sais inorgânicos, ácido clorídrico e por diversas enzimas gástricas, tais como a pepsina, a lipase gástrica e a amilase gástrica. O ácido clorídrico é essencial, uma vez que proporciona um pH óptimo para a digestão de proteínas, auxilia na absorção de ferro, activa a conversão do pepsinogénio (precursor inactivo da pepsina) em pepsina e tem uma acção bactericida, limitando a fermentação bacteriana (Gropper *et al*, 2005).

A pepsina é a principal enzima proteolítica do suco gástrico. Esta é uma enzima monomérica, cujo pH óptimo é de cerca de 2, apresentando uma redução da sua actividade a pH superior a 5, ocorrendo a sua desnaturação a pH superior a 7. A principal função da lipase gástrica é a degradação dos triglicéridos. Esta enzima encontra-se activa e estável em meio ácido, sendo que o seu pH óptimo é de cerca de 5,4 (Gargouri *et al*, 1988).

A secreção do suco gástrico por parte da mucosa do estômago é regulada por mecanismos nervosos e hormonais. As duas principais hormonas envolvidas neste processo são a gastrina e a enterogastrona. A gastrina é sintetizada pela mucosa do estômago e apresenta uma acção estimulante, enquanto que a enterogastrona é produzida no intestino delgado (duodeno), na presença de gordura, apresentando uma acção inibitória da secreção gástrica (Gropper *et al*, 2005).

A parede do estômago é constituída por camadas musculares que misturam os alimentos através dos movimentos peristálticos. Alguns compostos presentes nos alimentos, como, por exemplo, o etanol ou a nicotinamida, podem ser absorvidos ao nível do estômago (Kohlmeier, 2003). A acção do suco gástrico sobre o bolo alimentar origina o quimo que passa ao intestino

delgado através do piloro. O esvaziamento gástrico é progressivo e depende da composição e consistência do quimo, sendo mais rápido se este for líquido e rico em glúcidos e mais lento se este for rico em gorduras (Almeida & Afonso, 1997)

No intestino delgado completa-se a digestão química do quimo, originando o quilo. As secreções produzidas pelo fígado e pâncreas desempenham aqui um papel fundamental. Assim, a terceira e a última etapa da digestão química (intestino delgado) ocorre devido à acção de enzimas presentes no suco pancreático, no suco entérico e na bÍlis. O suco pancreático é produzido pelo pâncreas e posteriormente libertado no intestino delgado, através dos canais pancreáticos. Este suco apresenta um pH entre 7,8 e 8,2, devido ao elevado teor de bicarbonato e é composto por uma porção aquosa e outra enzimática. A porção aquosa é composta por iões sódio, potássio e iões bicarbonato que vão neutralizar a acidez do quimo que entra no intestino, proveniente do estômago. Quanto à porção enzimática, as principais enzimas que a constituem são a tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase, aminopeptidase, amilase pancreática, lipase pancreática, ribonuclease e desoxirribonuclease. Estas enzimas desempenham um papel essencial na digestão, uma vez que na sua ausência a digestão de lípidos, proteínas e glúcidos não ocorre de forma apropriada (Seeley *et al*, 2005; Gropper *et al*, 2005).

A tripsina é sintetizada pelas células pancreáticas sob a forma de um precursor inactivo denominado tripsinogénio, que posteriormente é activado pela enzima enteroquinase, sintetizada no intestino delgado, ou pela própria tripsina (autocatálise). Quanto à quimotripsina esta é sintetizada sob a forma de quimotripsinogénio, sendo activado pela tripsina. Após a sua activação, estas enzimas actuam sobre proteínas não digeridas ou parcialmente digeridas, transformando-as em peptídeos de reduzidas dimensões. A principal função das enzimas carboxipeptidase e aminopeptidase é a converção de peptídeos em aminoácidos (Gropper *et al*, 2005).

Em relação à amilase pancreática, a sua principal função é a hidrólise de polissacáridos a dissacáridos, enquanto que a lipase pancreática visa a hidrólise de lípidos neutros, ácidos gordos e glicerol. No que concerne às nucleases, ou seja a ribonuclease e a desoxirribonuclease, hidrolisam a fracções de menores dimensões (nucleótidos), os ácidos ribonucleico (RNA) e desoxirribonucleico (DNA), respectivamente (Seeley *et al*, 2005; Gropper *et al*, 2005).

A secreção do suco pancreático também é regulada pelo sistema nervoso e endócrino. A visão, o olfato, o paladar e também a presença do bolo alimentar no estômago, desencadeiam impulsos parassimpáticos que vão actuar sobre o pâncreas, estimulando-o a produzir suco pancreático, de forma moderada. A entrada do alimento no intestino estimula a produção de secretina e pancreosina, por parte da mucosa duodenal, que por sua vez estimulam o pâncreas a secretar mais suco pancreático (Gropper *et al*, 2005).

O suco entérico é sintetizado pela mucosa do intestino delgado. Este suco é composto por muco (protecção da parede intestinal contra a autodigestão), electrólitos, água e enzimas

(enteroquinase, erepsina, lipase, amilase, maltase, lactase e sucrase), apresentando um pH entre 6,5 e 7,5. O suco entérico é essencial à protecção da parede intestinal contra a acidez do quimo e à acção de enzimas digestivas pancreáticas. A sua produção é regulada por estímulos directos e reflexos (Seeley *et al*, 2005; Gropper *et al*, 2005).

A bÍlis é um fluído produzido pelo fÍgado e armazenado na vesÍcula biliar, que não apresenta enzimas. A presença de lípidos no intestino delgado estimula a produção da hormona colecistoquinina, por parte do intestino delgado. Esta vai actuar na parede da vesÍcula biliar, provocando a sua contracção e consequente eliminação de bÍlis para o intestino. A bÍlis é então secretada através dos ductos biliares até ao intestino, por acção de hormonas gastrointestinais (Valderrama *et al*, 2011).

A bÍlis é composta por sais biliares, que têm como funções a emulsificação de gorduras, de modo a facilitar a posterior acção das lipases, e a solubilização dos produtos finais da digestão lipídica, auxiliando assim a sua absorção pela mucosa intestinal. Os sais biliares são moléculas anfipáticas, ou seja possuem uma porção hidrofÍlica (solúvel em água) e outra hidrofóbica (insolúvel em água). Estes são detergentes de origem esteróide, que são biosintetizados pelo fÍgado, a partir de moléculas de colesterol. Os sais biliares têm a capacidade de solubilizar lípidos polares durante a digestão intestinal, processo que é essencial para a absorção pelo epitélio intestinal dos lípidos ingeridos. Os sais biliares desempenham ainda diversas funções, tais como, defesa contra microrganismos e desnaturação proteica antes da proteólise. Cerca de 95% dos sais biliares são reabsorvidos pelo Íleo e regressam ao fÍgado, onde estimulam uma maior produção de bÍlis. Este processo é denominado de circulação enterohepática (Seeley *et al*, 2005; Gropper *et al*, 2005; Valderrama *et al*, 2011).

À medida que vão avançando no intestino, quer os nutrientes, quer os não nutrientes, presentes nos alimentos vão sendo absorvidos. Essa absorção pode resultar de um processo de difusão passiva, transporte activo ou passivo utilizando transportadores ou pinocitose (Kohlmeier, 2003). Os compostos que não foram absorvidos ao longo do intestino delgado acabam por chegar ao cólon onde podem sofrer a acção da flora intestinal e onde ainda podem ser absorvidos (Williamson & Manach, 2005).

Durante muitos anos pensou-se que as enzimas necessárias à digestão eram sintetizadas sempre que necessárias, ou seja, após cada refeição, sendo que após a sua acção, estas enzimas, eram degradadas em aminoácidos, que eram posteriormente reabsorvidos pelo organismo. No entanto, têm surgido diversos estudos que demonstraram que as enzimas secretadas pelo pâncreas, após a sua acção, são absorvidas e recicladas através da circulação enteropancreática. Desta forma, e uma vez que a síntese destas enzimas implica um elevado gasto energético, sendo, desta forma, desfavorável para o organismo, estas enzimas entram na corrente sanguínea após a sua acção no intestino e circulam até ao pâncreas, onde são recicladas. Esta reciclagem só é possível porque as membranas do intestino e do pâncreas são permeáveis a estas enzimas e por

existir no sangue uma grande variedade de inibidores das enzimas digestivas, mais propriamente inibidores de proteases, que impedem assim que estas reajam com os próprios tecidos do organismo (Rothman *et al*, 2002). A existência de uma circulação enteropancreática da tripsina permite uma reserva considerável de energia, que pode ser aplicada no metabolismo ou numa nova síntese enzimática (Heinrich *et al*, 1979).

1.3.2. Simulação *in vitro* da Digestão Gastrointestinal

Actualmente, os modelos de digestão *in vitro* são amplamente utilizados com o objectivo de estudar, através da simulação das condições gastrointestinais, as alterações estruturais, a digestibilidade e a libertação de compostos presentes nos alimentos. Estes modelos compreendem, na sua generalidade, uma digestão com pepsina gástrica a pH ácido, seguida de uma digestão com pancreatina e sais biliares em condições ligeiramente alcalinas. Contudo, existem diversos factores que influenciam os resultados dos métodos de digestão *in vitro*, tais como, por exemplo, as características das amostras, actividade das enzimas, a composição iónica, os tempos de digestão e *stress* mecânico aplicado. Todos estes factores fazem com que não se consigam resultados completamente iguais aos obtidos *in vivo* (Hur *et al*, 2011).

Um dos factores mais importantes na simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* reside nas condições de incubação enzimática, mais propriamente, condições como por exemplo, a concentração das enzimas, as condições de pH aplicadas, a temperatura ou o tempo de incubação (Hur *et al*, 2011).

Diversos estudos têm sido efectuados para tentar estudar a estabilidade dos compostos bioactivos de várias infusões de plantas, às condições de digestão gastrointestinal, tendo os resultados obtidos, por este tipo de metodologia, sido um pouco controversos, na medida em que, dependendo das plantas, existem autores que sugerem a existência de alterações significativas após a digestão *in vitro*, enquanto outros não o verificam (Record & Lane, 2001; Porfírio *et al*, 2010; Siracusa *et al.*, 2011; Gião *et al.*, 2012).

Assim, em ensaios utilizando infusões de alcaparra (*Capparis spinosa* L.) e erva-doce do mar (*Crithmum maritimum* L.) verificou-se que o teor em compostos fenólicos totais, assim como a actividade antioxidante dos extractos diminuía significativamente nas infusões sujeitas a digestão, sugerindo, que os compostos fenólicos dominantes presentes nas amostras não digeridas não fossem estáveis nas condições gastrointestinais aplicadas. Os autores sugeriram que as alterações verificadas ao nível dos polifenóis estivessem, essencialmente, relacionadas com o pH do meio, na medida em que estes compostos parecem ser extremamente sensíveis às condições ligeiramente alcalinas do intestino delgado, podendo estas conduzir a alterações

estruturais que comprometam a sua actividade antioxidante (Siracusa *et al*, 2011). Os autores referem, igualmente, a possibilidade de durante a incubação pancreática poderem ocorrer reacções de isomerização do ácido clorogénico, que levassem à diminuição da actividade antioxidante total dos extractos (Siracusa *et al*, 2011).

Estudos realizados com infusões de chá verde e preto mostraram resultados variáveis após a digestão *in vitro*. Assim, enquanto que alguns compostos, tais como, o ácido gálico, não sofreram qualquer alteração após as condições aplicadas, outros, tais como a epigallocatequina diminuíram ligeiramente. No entanto, a actividade antioxidante dos chás em estudo diminuiu cerca de 28% e a concentração global de polifenóis diminuiu cerca de 32% (Record & Lane, 2001).

O estudo de Porfírio e colaboradores (2010) verificou que a actividade antioxidante de infusões de boldo-de-jardim (*Plectranthus barbatus*) não diminui após a simulação da digestão gástrica, mas que se reduzia em cerca de 50% após a digestão pancreática. A análise cromatográfica dos extractos revelou que, dependendo dos compostos analisados, as perdas podiam ir do negligenciável até uma degradação quase total (Porfírio *et al*, 2010). Também Gião e colaboradores (2012) verificaram que dependendo da sua estrutura os compostos antioxidantes podem ou não ser afectados pela simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. Estes autores sugerem que as catequinas resistem ao processo digestivo e que são, eventualmente, absorvidas ao nível sistémico, enquanto que os ácidos rosmarínico e o clorogénico sofrem perdas acentuadas ao longo da digestão (Gião *et al*, 2012).

Neste contexto, o principal objectivo deste trabalho foi o de avaliar se as propriedades antioxidantes das infusões de tília e cidreira, infusões de consumo corrente em Portugal se mantinham após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização das infusões das plantas medicinais

Na realização deste trabalho foram avaliadas duas infusões de plantas ou partes de plantas medicinais: cidreira e tília. As amostras utilizadas foram adquiridas comercialmente em ervanárias.

2.1.1. Infusão de Cidreira

A infusão de Cidreira (Figura 2.1) foi preparada a partir da planta de cidreira (*Melissa officinalis*). Caracteriza-se por uma cor amarelada e um aroma azedo e doce.



Figura 2.1 - Aspecto da Cidreira e respectiva infusão.

2.1.2. Infusão de Tília

A infusão de tília (Figura 2.2) foi preparada a partir da flor e folhas da planta de tília (*Tilia argentea*). Esta infusão caracteriza-se por uma cor amarelo claro e um aroma suave.



Figura 2.2 - Aspecto da tília e respectiva infusão.

2.2. Reagentes e enzimas

Na realização do presente trabalho foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de amônio (Riedel-de Haën, 98%), ácido acético (Panreac, 99%), ácido ascórbico (Panreac, 99%), ácido clorídrico (Panreac, 37%), ácido gálico monohidratado (Merck, 99,5%), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Acros, 98%), ácido tricloroacético (Riedel-de Haën, 99,5%), álcool etílico (Riedel-de Haën, 99%), azul de nitrotetrazólio (NBT²⁺) (Sigma), bicarbonato de sódio (Panreac, 99%), bílis bovina desidratada (Sigma B3883), carbonato de sódio (VReis), cloreto de cobre (II) bihidratado (Riedel-de Haën, 99%), cloreto de sódio (Panreac, 99,5%), cloreto de alumínio (Fluka, 99%), cloreto férrico hexahidratado (Merck, 99%), desoxirribose (Sigma, 99%), dihidrogenofosfato de potássio (Merck, 99,5%), dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) (Sigma, 97%), ferrozina (sigma), hidrogenofosfato de dipotássio (BDH Chemicals Lda, 97,5%), hidróxido de sódio (Merck, 99%), metossulfato de fenazina (PMS) (Sigma, 90%), neocuproína (Sigma), pancreatina de pâncreas de porco (Sigma P3292), pepsina de mucosa gástrica porcina (Sigma, P7125, Lote 030M15711V), peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Panreac, 30%), quercetina (Sigma), reagente de Folin-Ciocalteau (Panreac), sal dissódico de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Panreac, 99%), sulfato ferroso heptahidratado (Riedel-de Haën, 99). Na preparação de todas as soluções e diluições utilizou-se sempre água ultra-pura, captada a partir de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Molsheim, França).

2.3. Preparação das amostras

Na preparação das infusões das amostras adicionaram-se 100 mL de água fria a 5 g de cada planta. Cobriu-se a mistura com um vidro de relógio e colocou-se a aquecer sob agitação magnética. Quando a água entrou em ebulição deixou-se ferver durante três minutos e, de seguida, retirou-se do aquecimento e deixou-se ficar a mistura mais 15 minutos sob agitação magnética. Findo este tempo as infusões foram passadas por um passador, prensadas e filtradas a vácuo através de um filtro de papel (Whatman n.º 1). Cada infusão foi preparada em triplicado, tendo, no final os três filtrados de cada infusão sido misturados, homogeneizados e divididos em volumes iguais por três frascos. Um dos frascos armazenou-se a 4°C (amostra não digerida) e os restantes dois frascos foram sujeitos à simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal.

2.4. Simulação *in vitro* da Digestão Gastrointestinal

O procedimento de digestão realizado foi adaptado a partir de um método descrito por Gião e colaboradores (2012), com algumas modificações. Assim as infusões foram acidificadas

com ácido clorídrico 1 N até ficarem com a pH 2,0, tendo, em seguida, sido adicionado 0,05 mL de solução de pepsina (25 mg/mL em HCl 0,1 N) por cada mL de infusão. As amostras foram embrulhadas em papel de alumínio e incubadas em banho a 37 °C, durante duas horas, com uma agitação de 100 rpm. Findo o tempo de incubação, os digeridos gástricos foram submetidos a uma digestão intestinal. Para tal, adicionou-se às amostras o volume de NaHCO₃ 1 M até se atingir o valor de pH 6,0. Em seguida adicionaram-se 0,25 mL de uma solução mista de pancreatina e bÍlis bovina (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de bÍlis bovina em NaHCO₃ 0,1 M) por cada mL de amostra. As amostras, ainda embrulhadas em papel de alumínio, foram incubadas em banho a 37 °C durante uma hora, com uma agitação de 45 rpm. Após determinação do volume final das amostras digeridas e de qual o frasco com maior volume, acrescentou-se água ultra-pura a todos os outros frascos (amostras não digeridas e digeridas), para que ficassem todos com o mesmo volume final. Todas as amostras (digeridas e não digeridas) sofreram um processo de inativação enzimática por submersão em água a 100 °C durante 4 minutos, seguida de choque térmico por armazenamento em gelo durante 10 minutos. Findo este tempo, as amostras foram novamente filtradas a vácuo, através de um filtro de papel (Whatman n.º 1) e depois por membrana estéril (Millipore Millex GP) com poro de 0,22 µm, sendo aliqüotadas em microtubos tipo Eppendorf estéreis (cerca de 1,5 mL de amostra por cada microtubo) e armazenadas em caixas a -60 °C. Paralelamente à digestão das amostras realizou-se um ensaio controlo, em que se substituiu a amostra por igual volume de água ultra-pura, tendo o restante procedimento sido exactamente igual ao anteriormente descrito para as infusões.

2.5. Determinação de fenóis totais através do método Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu baseia-se na redução a pH alcalino do heteropolianíon molibdotungsteniofosfórico do reagente de Folin-Ciocalteu, efectuada pelos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, da amostra e que origina o aparecimento de um produto azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a intensidade da coloração desenvolvida proporcional ao teor em compostos fenólicos (Singleton *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2005). Este método é simples, sensível e preciso mas pode sofrer interferências de outros componentes da amostra que possam, igualmente, reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu como, por exemplo, adenina, adenosina, alanina, ácido aminobenzóico, ácido ascórbico, benzaldeído, cisteína, creatinina, histamina, histidina, índole, frutose, sacarose, sulfito de sódio, sulfato de ferro e outros (Prior *et al.*, 2005).

Para a determinação dos compostos fenólicos totais utilizou-se o método descrito por Kosar e colaboradores (2008) com algumas modificações. Assim, em balões volumétricos de 10

mL, contendo cerca de 6 mL de água ultrapura, adicionou-se o volume adequado de cada amostra, recorrendo a diluições (infusões antes e após digestão e controlo de digestão), e 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu sem diluição. Deixou-se um minuto à temperatura ambiente, adicionou-se 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% (peso/volume) e fez-se o volume a 10 mL com água ultrapura. As misturas assim preparadas foram incubadas durante 2 horas, a 25 °C e no escuro. Findo este tempo, procedeu-se então à medição da absorvância das amostras num espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 765 nm, contra um branco preparado da mesma forma mas substituindo a amostra por água ultrapura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado, tendo a concentração em fenóis sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita mas substituindo as amostras por soluções de ácido gálico com concentrações entre os 50 e os 500 mg/L.

Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de infusão.

2.6. Quantificação dos Flavonóides Totais

A quantificação dos flavonóides totais está assente no facto de, em meio alcoólico, ocorrer a formação de complexos estáveis entre o alumínio e os flavonóides, o que origina um desvio para comprimentos de onda mais elevados do máximo de absorção destes compostos. Assim, é possível avaliar a quantidade de flavonóides presentes na amostra em estudo, sem a interferência de outros compostos fenólicos, essencialmente dos ácidos fenólicos, que constantemente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. Estes ácidos formam complexos com o cloreto de alumínio, no entanto estes absorvem comprimentos de onda inferiores (Lianda e Castro, 2008). O método pode ser pouco exacto, já que o valor de flavonóides totais determinado pode ser diferente (normalmente inferior) do valor real presente na amostra em estudo. O valor obtido e o real são tanto mais próximos quanto maior a proporção de flavonóis da amostra, devido ao facto do comprimento de onda utilizado, ou seja, 425nm, corresponder ao máximo de absorção do complexo quercetina-alumínio. Sendo assim, os complexos de flavanonas e flavanóis com o alumínio, que absorvem na gama entre 310 e 320 nm, não contribuem para a absorvância a 425 nm (Popova *et al.*, 2004).

O teor em flavonóides foi doseado de acordo com o método descrito por Popova e colaboradores (2004), com recurso a algumas adaptações. Assim, misturou-se em balões de 10mL, 1000 µL de amostra (infusões antes e após digestão e controlo de digestão), com 400 µL de uma solução 20 g/L de cloreto de alumínio em etanol e 500 µL de ácido acético e completou-se o volume com etanol. Para todas as amostras foram preparados os respectivos brancos, sem

adição de cloreto de alumínio. Após um período de incubação de 40 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, efectuou-se a leitura da absorvância, a 425 nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500), de todas as amostras contra o respectivo branco. A concentração de flavonóides foi determinada por interpolação de uma recta de calibração elaborada como descrito anteriormente, mas substituindo as amostras por soluções alcoólicas de quercetina, com concentrações entre 1 e os 10 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em mg de equivalentes de quercetina por litro de infusão.

2.7. Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais

2.7.1. Determinação da actividade antioxidante através do ensaio CUPRAC

O método CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) consiste na redução do Cu(II) para Cu(I) através da acção de antioxidantes redutores, presentes numa amostra. Esta reacção origina um complexo Cu-neocuproina (Cu(I)-neocuproina) na forma reduzida, que apresenta uma coloração intensa, com um máximo de absorção a 450 nm. Como tal, a redução da forma oxidada do complexo referido pelos componentes da amostra é determinada espectrofotometricamente, mediante a leitura da absorvância a 450 nm (Apak *et al.*, 2004).

A avaliação da actividade antioxidante das infusões em estudo foi efectuada através do ensaio CUPRAC (redução do Cu(II)-neocuproina), de acordo com o método descrito por Apak e colaboradores (2004), com algumas adaptações. Para tal, adicionaram-se em tubos de ensaio, 1 mL de cada uma das seguintes soluções: cloreto de cobre (II) bihidratado (10mM), acetato de amónio (1M) e neocuproína (7,5 mM em etanol 96%). Ao mesmo tubo adicionaram-se de seguida os volumes adequados (entre 7,5 e 15 µL) de cada uma das amostras antes e após digestão, bem como do controlo de digestão, perfazendo com água ultra-pura para se obter um volume final de 4,1 mL. Após incubação de uma hora à temperatura ambiente e no escuro, efectuou-se a leitura da absorvância das amostras a 450nm (espectrofotómetro SPEKOL 1500), utilizando como branco a mesma mistura mas substituindo a amostra por igual volume de água.

As amostras foram analisadas em triplicado tendo a actividade antioxidante sido determinada por interpolação de uma recta de calibração, preparada da forma já descrita, substituindo apenas as amostras por 1,1 mL das soluções padrão de ácido ascórbico (15,625; 31,25; 62,5; 125; e 250 µM). Os resultados foram expressos em µmol equivalente de ácido ascórbico por litro de infusão.

2.7.2. Determinação da capacidade de quelação de Fe(II)

A capacidade de quelação do ferro pode ser considerada um mecanismo de actividade antioxidante, na medida em que este metal pode estar envolvido em reacções de Fenton, que levam à formação de espécies reactivas de oxigénio (Huang *et al.*, 2005; Magalhães *et al.*, 2008). Esta aptidão para efectuar a quelação do ferro pode ser verificada com base na possibilidade da ferrozina formar complexos, de coloração vermelha, com o ferro ($[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4+}$), complexos esses que apresentam um máximo de absorção de 562 nm. Na presença de agentes quelantes a formação destes complexos é dificultada o que resulta numa diminuição da intensidade da cor. Desta forma, a medição da diminuição da intensidade da absorção a 562 nm permite efectuar uma estimativa da capacidade de quelação do ferro da amostra (Geckil *et al.*, 2005).

A capacidade de quelação de ferro foi determinada de acordo com a técnica descrita por Lima e colaboradores (2010). Assim, adicionou-se num microtubo 75 μL de cada uma das amostras a analisar (infusões antes e após digestão e controlo da digestão) e 40 μL de solução de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mM), seguindo-se uma incubação de cinco minutos à temperatura ambiente. Findo este tempo adicionaram-se 80 μL de solução de ferrozina (5 mM), perfazendo-se o volume a 800 μL com água ultra-pura. O controlo negativo e os controlos de interferência para cada amostra analisada foram preparados da mesma forma, no entanto no primeiro substituiu-se o volume de amostra por igual volume de água ultra-pura, enquanto que no segundo substituiu-se o volume de reagentes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e ferrozina) por igual volume de água ultra-pura. Após agitação vigorosa, procedeu-se a uma nova incubação durante dez minutos à temperatura ambiente em ambiente escuro e, findo esse tempo, procedeu-se à leitura das respectivas absorvâncias em espectrofotómetro (SPEKOL 1500) a 562 nm, contra água ultra-pura. Todas as amostras foram analisadas em triplicado e a capacidade antioxidante por quelação do Fe(II) das mesmas foi determinada por interpolação de uma curva de dose-resposta construída com soluções-padrão de EDTA em água (concentrações finais de 0 a 2 mM), preparadas e analisadas de acordo com o mesmo protocolo aplicado às amostras, apenas substituindo o volume de amostra por 75 μL de EDTA da concentração correspondente, após calculada a percentagem de inibição da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{ferrozina})_3]^{4+}$, dada pela equação:

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{controlo negativo}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{controlo interferência}}) / (\text{Abs}_{\text{controlo negativo}})] \times 100$$

2.7.3 Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano

O radical do anião superóxido reage com o NBT^{2+} , reduzindo-o a formazano (Figura 2.3). Este composto apresenta uma coloração azul, com um máximo de absorção a 560 nm. Assim, qualquer molécula com a capacidade de sequestrar o radical superóxido origina uma diminuição da velocidade de redução do NBT^{2+} , que se traduz por uma diminuição da taxa de aumento da absorvância a 560 nm (Halliwell *et al.*, 1995).

Neste ensaio, o radical anião superóxido foi gerado pelo sistema PMS e pelo NADH: o PMS, após ter sido reduzido pelo NADH, reage com o oxigénio, produzindo o radical do anião superóxido (Nakamura *et al.*, 1992). Uma vez que este radical se pode formar *in vivo* no decurso dos processos metabólicos, uma das vantagens deste ensaio é a de utilizar um oxidante com relevância fisiológica (Magalhães *et al.*, 2008).

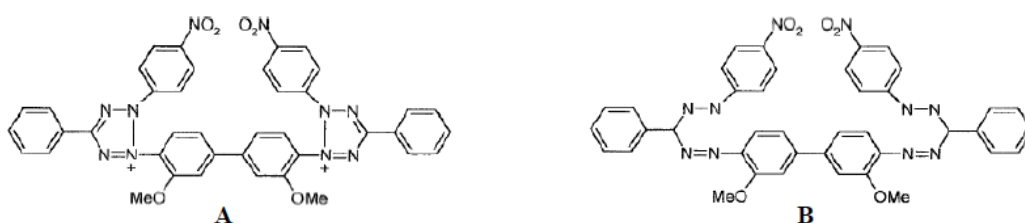


Figura 2.3 - Estrutura do (A) NBT^{2+} e do (B) formazano

A capacidade das amostras para sequestrar o radical do anião superóxido foi determinada de acordo com o método descrito por Valentão e colaboradores (2001), recorrendo a pequenas adaptações. Sendo assim, adicionaram-se em cuvetes do espectrofotómetro diferentes volumes das amostras (infusões antes e após digestão e controlo da digestão), ou das suas diluições, de modo a testar diferentes concentrações, completando-se posteriormente com água ultra pura, até 200 μL . Seguidamente, adicionaram-se 300 μL de NADH, 1,66 mM, em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4), 300 μL de NBT^{2+} , 430 μM , em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) e tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) a fim de se completar o volume a 2 950 μL . A reacção iniciou-se com a adição de 50 μL de PMS, 162 μM , em tampão fosfato (19 mM, pH 7,4) acompanhando-se a variação da absorvância a 560 nm, durante dois minutos à temperatura ambiente. Realizou-se, igualmente, um ensaio controlo substituindo a amostra por igual volume de solvente da amostra (água ultra pura). As determinações foram realizadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500). A percentagem de inibição da redução do NBT^{2+} de cada

uma das concentrações das amostras foi calculada em relação ao controlo recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}} - \text{Variação}_{\text{absorvância da amostra}}) / (\text{Variação}_{\text{absorvância do controlo}})] \times 100$$

Posteriormente foram elaboradas as curvas de percentagem de inibição *versus* concentração, de modo a determinar a concentração de chá que provocou 50% de inibição da redução do NBT²⁺, ou seja, o valor de IC₅₀.

2.7.4 Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo através do ensaio de degradação da desoxirribose

A degradação da desoxirribose pelo radical hidroxilo origina diversos produtos, entre os quais o malonildialdeído (MDA), que em meio ácido e a temperatura elevada, reage com o TBA, originando compostos com uma coloração cor-de-rosa, que podem ser, posteriormente, quantificados espectrofotometricamente, por determinação da absorvância de 532 nm (Halliwell *et al.*, 1995). Se se adicionar à mistura reaccional um composto capaz de sequestrar ou prevenir a formação (por desactivação do H₂O₂) do radical hidroxilo, verifica-se uma menor degradação da desoxirribose e, conseqüentemente, uma diminuição da absorvância a 532 nm. O radical hidroxilo é uma das ROS formada *in vivo*, o que faz com que a aplicação deste método laboratorial apresente a vantagem de se utilizar um oxidante com relevância fisiológica.

Os radicais hidroxilo utilizados neste método foram gerados através da reacção entre o H₂O₂ e o Fe²⁺ (reacção de Fenton), adicionado sob a forma de Fe³⁺ na presença de EDTA, e do ácido ascórbico, necessário à redução do ferro e iniciação da reacção:



A formação do complexo Fe-EDTA evita a formação de complexos entre o ferro e as substâncias presentes nas misturas de ensaio, a desoxirribose ou o ácido ascórbico, não impedindo a participação do ferro na reacção de Fenton (Chobot, 2010). Quando o ensaio é realizado na ausência de EDTA a desoxirribose pode quelar o Fe(III) o que origina uma maior degradação desta molécula, devido à síntese *site specific* dos radicais hidroxilo (Chobot, 2010).

A capacidade das amostras para sequestrar o radical hidroxilo foi determinada com base no método descrito por Gaspar e seus colaboradores (1996), no entanto com recurso a algumas adaptações. As determinações foram efectuadas em triplicado, num espectrofotómetro (SPEKOL 1500), a 532 nm. Num tubo de ensaio adicionou-se pela seguinte ordem: 690 µL de tampão de fosfatos de potássio (15 mM e pH 7,4), 100 µL de amostra, 100 µL de desoxirribose (28 mM), 50 µL de H₂O₂ (28,4 mM), 50 µL de solução de FeCl₃/EDTA (FeCl₃ 400 µM dissolvido em 2mM de Na₂EDTA.2H₂O) e por fim, 10 µL de ácido ascórbico 5 mM, perfazendo, assim, um volume final de 1 mL. Esta mistura reaccional foi incubada a 37°C durante uma hora. Após esse período, adicionou-se 1 mL de solução de TBA (1% p/v em NaOH 50 mM) e 1 mL de ácido tricloroacético (2,8% p/v). A solução resultante foi aquecida durante 15 minutos, em banho de água, a 100°C. Terminado o tempo de incubação, a amostra foi sujeita a um arrefecimento, com posterior leitura da absorvância a 532 nm. Realizou-se, igualmente, um branco, contendo todos os componentes da mistura reaccional substituindo a desoxirribose por igual volume de água, a fim de averiguar a existência de produtos TBA reactivos, provenientes de contaminantes presentes no material ou reagentes. Efectuou-se, igualmente, um controlo positivo, contendo todos os componentes da mistura reaccional, substituindo a amostra por igual volume de água.

Os resultados foram expressos em percentagem de inibição da formação de produtos reactivos face ao TBA relativamente ao controlo positivo, calculada recorrendo à seguinte expressão:

$$\% \text{Inibição} = [(\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}} - \text{Absorvância}_{\text{amostra}}) / (\text{Absorvância}_{\text{controlo positivo}})] \times 100$$

2.8. Análise Estatística dos Resultados

O tratamento estatístico dos dados foi efectuado utilizando o *software* “Microsoft Office Excel 2007” (Microsoft Corporation, Washington). Nesse sentido foram realizados o teste t e regressões lineares.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação dos fenóis totais pelo Método Folin-Ciocalteu

O teor de fenóis totais foi determinado com recurso ao método Folin-Ciocalteu e os resultados obtidos expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro de infusão. A Figura 3.1 apresenta a curva de calibração com ácido gálico, enquanto que os resultados referentes à composição em compostos fenólicos totais das amostras em estudo se encontram presentes na tabela 3.1.

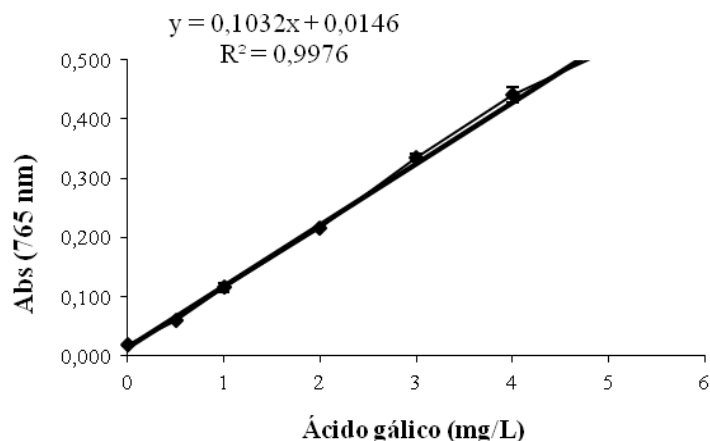


Figura 3.1 – Recta de calibração de ácido gálico utilizada na determinação dos polifenóis totais.

Tabela 3.1 – Teor em compostos fenólicos totais das amostras em estudo.

| Amostras | Compostos fenólicos totais (mg eq. ácido gálico/L) |
|-----------------------|--|
| Cidreira não digerida | 2222,3 ^a ± 123 |
| Cidreira digerida | 2139,1 ^a ± 76 |
| Tília não digerida | 886,8 ^b ± 17 |
| Tília digerida | 685,8 ^c ± 12 |
| Branco da digestão | 10,8 ^d ± 1 |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$)

Comparando as infusões das duas plantas é possível verificar que a infusão de cidreira apresenta, tanto antes como após a digestão *in vitro*, um teor em fenóis totais significativamente superior ao da infusão de tília. A comparação do teor de fenóis totais das infusões de tília e cidreira, antes da simulação da digestão gastrointestinal, com outros valores publicados na

literatura torna-se difícil devido aos procedimentos de preparação das amostras ser bastante variável no que concerne aos solventes utilizados (água, metanol, etanol, misturas de etanol e água, etc.), e ao tempo e temperatura de extracção. No entanto, num estudo realizado por Pereira e colaboradores (2009), em que se comparou o teor em polifenóis totais das infusões de cidreira, camomila e erva príncipe, a infusão de cidreira também se destacou ao apresentar um teor em compostos fenólicos totais duas a três vezes superiores ao das restantes infusões. Esta tendência está de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho.

Os resultados obtidos mostram que a simulação da digestão gastrointestinal exerce um efeito diferente sobre infusões das duas plantas em estudo. Assim, a infusão de cidreira apresentou valores semelhantes (teste t com $p > 0,05$) de compostos fenólicos antes e após o processo de digestão *in vitro*, sendo estes bastante elevados, o que permite afirmar que, possivelmente, os compostos fenólicos que constituem esta infusão são resistentes às condições de digestão gastrointestinal. Pelo contrário, o teor de compostos fenólicos da infusão de tília antes e após digestão *in vitro* foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), verificando-se uma redução de cerca de 23% após o processo digestivo, o que indica que, possivelmente, estes compostos são afectados por este processo. O resultado obtido com branco da digestão mostra a existência, nas soluções enzimáticas utilizadas, de compostos capazes de reduzir o reagente de Folin, no entanto o resultado é baixo quando comparado com o das infusões e, deste modo, pode considerar-se esta interferência negligenciável.

Os resultados sugerem que os principais compostos fenólicos presentes nas infusões de tília e cidreira sejam diferentes e, por isso, tenham diferentes sensibilidades à simulação da digestão gastrointestinal. A existência de compostos fenólicos com diferentes sensibilidades a este processo já foi descrita em relação a outros tipos de infusões de plantas, o que vai de encontro às evidências de um outro estudo, que refere que enquanto alguns compostos fenólicos são sensíveis à digestão *in vitro* outros não são afectados por este processo (Record & Lane, 2001; Porfírio *et al.*, 2010; Gião *et al.*, 2012).

3.2. Determinação de flavonóides totais

Para a avaliação do teor de flavonóides presentes nas amostras em estudo utilizou-se o método de complexação com o alumínio, sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de quercetina por Litro de infusão. A Figura 3.2 apresenta a curva de calibração de quercetina, enquanto que os resultados referentes à composição em flavonóides totais das amostras em estudo se encontram presentes na tabela 3.2.

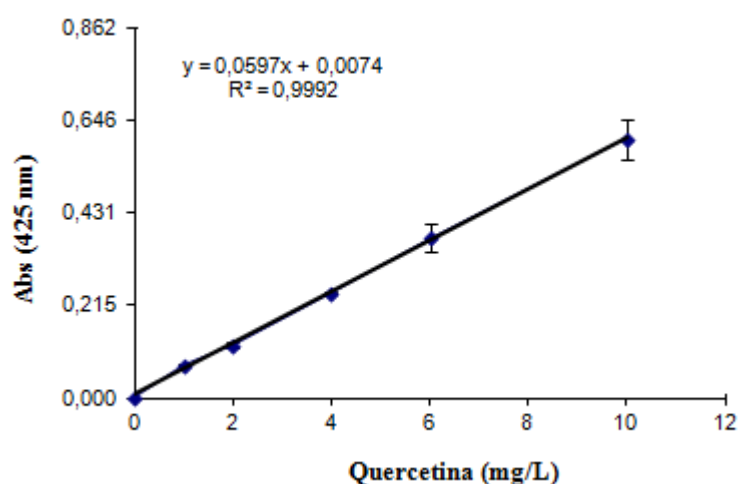


Figura 3.2 – Recta de calibração de quercetina utilizada na determinação dos flavonóides totais.

Tabela 3.2 – Teor de flavonóides totais das amostras em estudo.

| Amostra | Flavonóides totais (mg eq. quercetina/L) |
|-----------------------|--|
| Cidreira não digerida | 8,0 ^a ± 1 |
| Cidreira digerida | 9,0 ^a ± 1 |
| Tília não digerida | 20,3 ^b ± 0,4 |
| Tília digerida | 17,0 ^c ± 1 |
| Branco da digestão | não detectado |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Os resultados mostram, que ao contrário do verificado com o teor em fenóis totais, o teor de flavonóides totais é superior nas infusões de tília do que nas de cidreira. Estes resultados confirmam a sugestão feita anteriormente, sobre a diferente natureza dos compostos fenólicos presentes nas infusões destas duas plantas, parecendo que na infusão de tília os flavonóides tenham uma contribuição mais significativa para o total de compostos fenólicos do que na infusão de cidreira. Estes resultados estão de acordo com os resultados publicados por Carnat e colaboradores (1998), que mostram que os ácidos hidroxicinâmicos têm um peso significativamente superior ao dos flavonóides na fracção fenólica presente nas folhas secas de cidreira.

Os teores de flavonóides na infusão de Cidreira não digerida e digerida são semelhantes ($p>0,05$), no entanto, o mesmo não se verifica nas infusões de tília não digerida e digerida. Desta forma, mesmo os flavonóides presentes em ambas as infusões parecem ser diferentes sendo os flavonóides existentes na infusão de tília mais sensíveis às condições da digestão *in vitro*. A comparação entre o decréscimo verificado no teor em fenóis totais sofrido pela infusão de tília após digestão, cerca de 23%, e o decréscimo verificado no teor em flavonóides, cerca de 16%, sugere a existência nesta infusão de outros compostos fenólicos igualmente sensíveis às condições da digestão *in vitro* realizada. De qualquer forma, o facto do decréscimo no teor de flavonóides sofrido pela infusão de tília após digestão ter sido de apenas 16%, sugere que a maioria dos flavonóides presentes nesta infusão não seja afectada pelo processo digestivo.

3.3. Determinação da actividade antioxidante das diferentes infusões medicinais

Uma vez que não existe um único mecanismo de actividade antioxidante, esta foi avaliada, nas amostras em estudo, recorrendo a ensaios que detectam diferentes destes mecanismos. Assim, o potencial antioxidante foi estimado recorrendo a ensaios que avaliaram a capacidade redutora das infusões (ensaio CUPRAC), a capacidade de quelação do ferro (II), e a capacidade de sequestro de ROS (radical hidroxilo e radical anião superóxido).

3.3.1. Actividade antioxidante determinada pelo ensaio CUPRAC

Os valores CUPRAC das amostras testadas foram determinados por interpolação de uma recta de calibração realizada com ácido ascórbico (Figura 3.3) e expressos em mmol de ácido ascórbico por Litro de infusão, encontrando-se os resultados obtidos na Tabela 3.3.

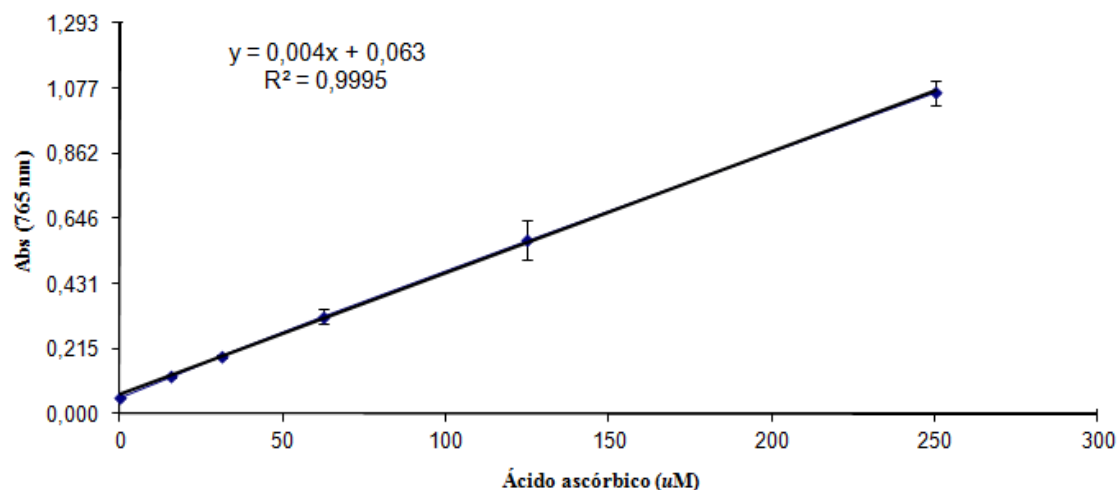


Figura 3.3 – Recta de calibração do ácido ascórbico utilizada no ensaio CUPRAC.

Tabela 3.3 – Resultados obtidos no ensaio CUPRAC das amostras em estudo.

| Amostras | Valor de CUPRAC (mmol ácido ascórbico/L) |
|-----------------------|--|
| Cidreira não digerida | 34,0 ^a ± 0,6 |
| Cidreira digerida | 31,5 ^b ± 0,5 |
| Tília não digerida | 10,6 ^c ± 0,4 |
| Tília digerida | 8,1 ^d ± 0,1 |
| Branco da digestão | não detectado |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

A análise dos presentes resultados permite verificar que as amostras de cidreira (não digerida e digerida) apresentaram uma capacidade redutora superior às de tília (não digerida e digerida), indicando que, segundo o ensaio CUPRAC, a infusão de cidreira apresenta uma actividade antioxidante superior à infusão de tília, quer antes, quer após a simulação da digestão gastrointestinal. Os valores de CUPRAC mais elevados, que se verificaram na infusão de cidreira, sugerem ou que não sejam os flavonóides os compostos fenólicos que mais contribuem para esta actividade, uma vez que a infusão de tília apresentou um teor de flavonóides mais elevado, ou que os flavonóides presentes nas duas infusões sejam diferentes, sendo os presentes na infusão de cidreira bastante mais activos.

Verificou-se a existência de diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as amostras de cidreira não digerida e digerida, bem como entre as amostras de tília não digerida e digerida,

sendo que as amostras não digeridas apresentaram uma actividade redutora superior às digeridas e, conseqüentemente, uma actividade antioxidante superior (segundo o método CUPRAC). Contudo, a redução verificada na actividade antioxidante da infusão de cidreira após digestão foi menos acentuada (cerca de 9%) do que a verificada na infusão de tília (cerca de 24%). Dado ser conhecido o papel preponderante que os compostos fenólicos, e, em particular, os flavonóides, desempenham na actividade antioxidante dos alimentos de origem, em particular das infusões de plantas medicinais, este resultado está de acordo com os resultados dos teores em fenóis e flavonóides totais anteriormente apresentados. Assim, a maior perda destes compostos sofrida pela infusão de tília durante o processo digestivo, quando comparada com a infusão de cidreira, faz com que seja também esta infusão a ter uma quebra mais acentuada na actividade antioxidante detectada pelo ensaio CUPRAC.

3.3.2. Determinação da capacidade de quelação de Fe (II)

Para a determinação da capacidade de quelação de Fe(II) efectuou-se uma curva de calibração com o EDTA. Esta curva mostra a percentagem de inibição da formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4+}$, exercida por diferentes concentrações de EDTA (Figura 3.4). Os resultados obtidos com as diferentes amostras neste ensaio, expressos em μmol equivalente de EDTA por Litro de infusão, encontram-se na Tabela 3.4.

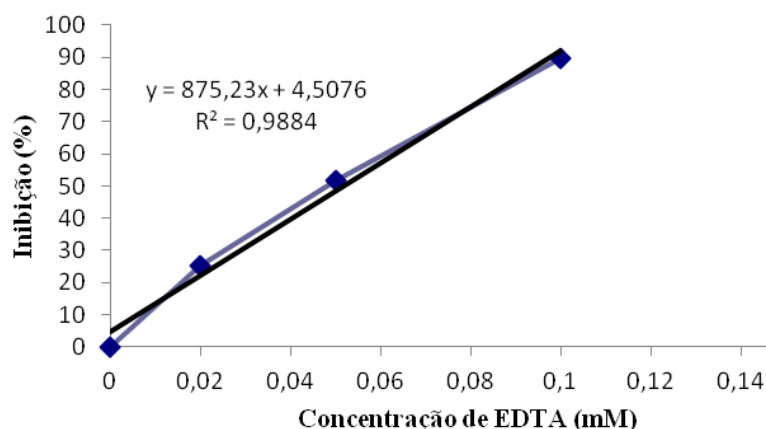


Figura 3.4 – Curva de calibração de EDTA utilizada no ensaio de determinação da quelação do Fe(II).

Tabela 3.4 – Resultados da capacidade de quelção de Fe (II) das amostras em estudo.

| Amostra | μM de EDTA |
|-----------------------|-----------------------|
| Cidreira não digerida | $21,9^a \pm 1$ |
| Cidreira digerida | $94,4^b \pm 3$ |
| Tília não digerida | $54,1^c \pm 2$ |
| Tília digerida | $90,8^b \pm 2$ |
| Branco da digestão | $105,6^d \pm 2$ |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

O ensaio de avaliação da capacidade de quelção do Fe(II) demonstrou, que tanto a infusão de cidreira como a infusão de tília, possuem compostos capazes de inibir a formação dos complexos $[\text{Fe}(\text{Ferrozina})_3]^{4+}$, isto é de compostos capazes de efectuar a quelção do Fe(II). Esta capacidade é, no entanto, mais significativamente superior na infusão de tília do que na infusão de cidreira, o que pode sugerir um maior envolvimento dos flavonóides nesta actividade. Neste ensaio verificou-se a existência de interferência por parte das enzimas utilizadas durante a digestão *in vitro*. Com efeito, o branco da digestão apresentou uma capacidade de quelção de ferro superior a qualquer uma das amostras, impossibilitando assim a avaliação do efeito da digestão sobre os compostos envolvidos neste mecanismo de actividade antioxidante presentes em ambas as infusões.

3.3.3. Determinação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo

Para a avaliação da capacidade de sequestro do radical hidroxilo aplicou-se o ensaio de degradação da desoxirribose, sendo os resultados obtidos expressos em percentagem de inibição da degradação deste açúcar (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 - Percentagem de inibição da degradação da desoxirribose das amostras em estudo

| Amostras | % Inibição |
|-----------------------|------------------|
| Cidreira não digerida | $40,3^a \pm 0,9$ |
| Cidreira digerida | $51,2^b \pm 2,1$ |
| Tília não digerida | $32,3^b \pm 0,4$ |
| Tília digerida | $64,0^c \pm 0,6$ |
| Branco da digestão | $68,4^d \pm 1,7$ |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t ($p < 0,05$).

Após análise dos resultados apresentados é possível constatar que tanto as infusões de tília como as de cidreira, possuem compostos capazes de sequestrar o ião hidroxilo, impedindo, desta, forma a degradação da desoxirribose, o que resulta numa diminuição da absorvância a 532 nm. A infusão de Cidreira não digerida apresenta um valor significativamente superior ao da infusão de tília não digerida e, conseqüentemente, uma actividade antioxidante superior. Estes resultados sugerem ou que não sejam os flavonóides os compostos fenólicos que mais contribuem para esta actividade, uma vez que a infusão de tília apresentou um teor de flavonóides mais elevado, ou que os flavonóides presentes nas duas infusões sejam diferentes, sendo os presentes na infusão de cidreira bastante mais activos.

Também neste ensaio se verificou a existência de interferência por parte das enzimas utilizadas durante a digestão *in vitro*, tendo o branco da digestão apresentado uma capacidade de sequestro do radical hidroxilo superior a qualquer uma das amostras, impossibilitando assim a avaliação do efeito da digestão sobre os compostos envolvidos neste mecanismo de actividade antioxidante presentes em ambas as infusões.

3.3.4. Determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido detectada pela diminuição da formação de formazano

Para a determinação da capacidade de sequestro do radical anião superóxido das amostras em estudo recorreu-se ao método da inibição da formação de formazano. A capacidade de sequestro do radical anião superóxido foi determinada com diferentes percentagens de amostra na mistura reaccional, de modo a poderem ser construídas curvas de dose resposta para cada amostra e calculado o respectivo valor de IC₅₀, ou seja a percentagem de amostra na mistura reaccional responsável por 50% de inibição da formação do formazano.

Todas as amostras apresentaram capacidade de sequestrar o radical anião superóxido, uma vez que, em relação ao controlo, todas as amostras conduziram a uma diminuição da velocidade de formação do formazano, resultante da redução do NBT²⁺ pelo radical anião superóxido. Esta actividade é particularmente importante uma vez que *in vivo* ocorre a formação desta espécie radicalar. A percentagem de inibição da formação de formazano aumentou com o aumento da quantidade de amostra presente na mistura reaccional atingindo-se, em algumas amostras, um patamar de saturação (Figura 3.5). Neste ensaio não se verificou interferência do branco da digestão. Os valores de IC₅₀ das diferentes amostras para este ensaio encontram-se na Tabela 3.6.

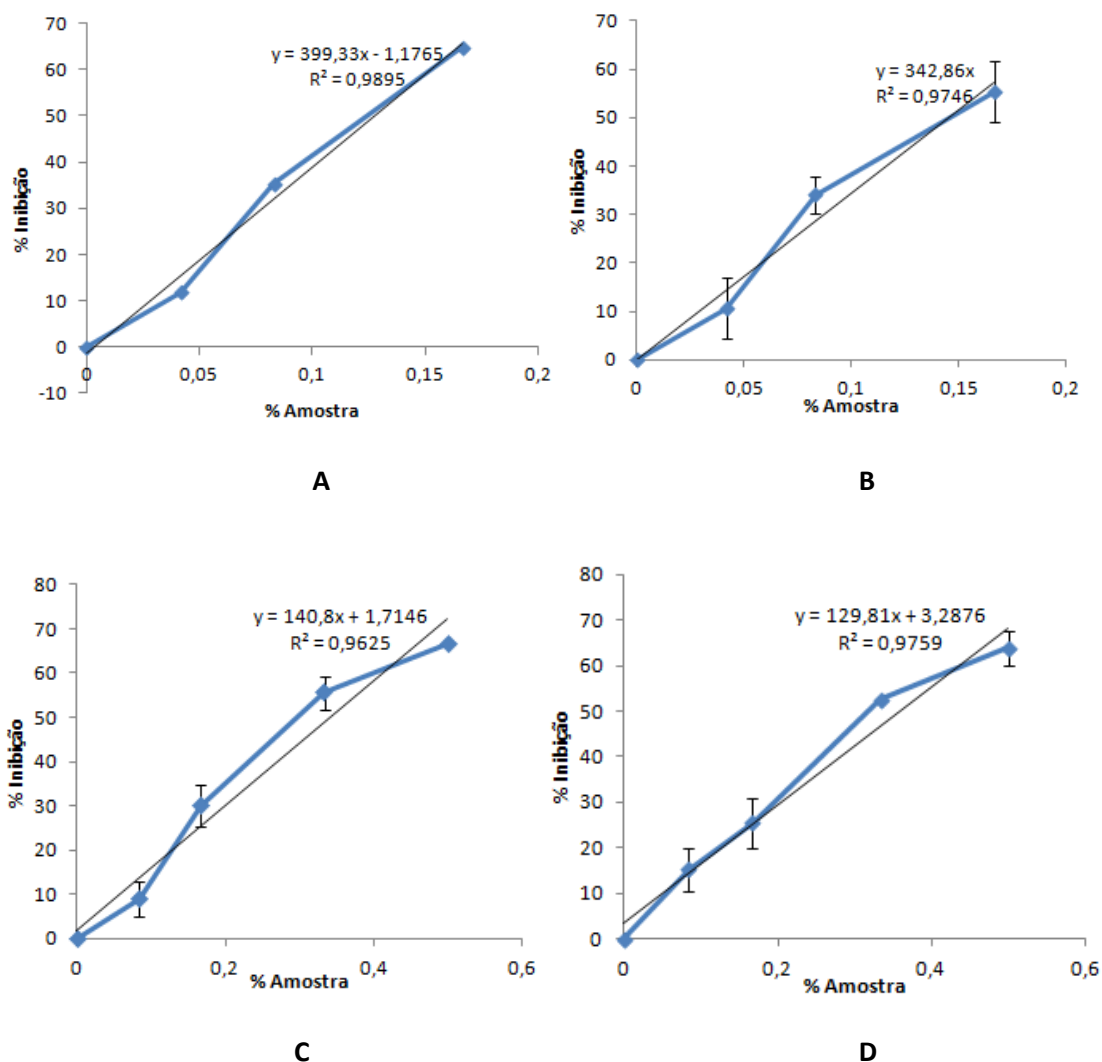


Figura 3.5 - Efeito das infusões de (A) Cidreira não digerida, (B) Cidreira digerida, (C) Tília não digerida e (D) Tília digerida na redução do NBT2⁺ induzida pelo radical anião superóxido.

Tabela 3.6 - Valores de IC₅₀ (% de amostra) das diferentes amostras para a actividade de sequestro do radical anião superóxido

| Amostra | IC ₅₀ (% de amostra) |
|-----------------------|---------------------------------|
| Cidreira não digerida | 0,13 ^a ± 0,01 |
| Cidreira digerida | 0,15 ^a ± 0,02 |
| Tília não digerida | 0,30 ^b ± 0,02 |
| Tília digerida | 0,34 ^b ± 0,03 |
| Branco da digestão | não detectado |

Médias com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste t (p<0,05).

Os valores de IC_{50} das infusões em estudo variaram entre cerca de 0,1 e 0,3%, sendo que as amostras de cidreira apresentaram valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) aos valores das infusões de tília, o que, neste caso, indica uma maior capacidade de sequestro do radical anião superóxido, já que significa que é necessária uma quantidade inferior de amostra para se atingir os 50% de inibição. Mais uma vez os resultados sugerem ou que não sejam os flavonóides os compostos fenólicos que mais contribuem para esta actividade, uma vez que a infusão de tília apresentou um teor de flavonóides mais elevado, ou que os flavonóides presentes nas duas infusões sejam diferentes, sendo os presentes na infusão de cidreira bastante mais activos. Em qualquer um dos casos os principais compostos envolvidos nesta actividade de sequestro não parecem ser afectados pelas condições da digestão *in vitro*, uma vez que tanto a infusão de cidreira, como a infusão de tília apresentaram valores de IC_{50} semelhantes ($p > 0,05$) segundo o teste t, antes e após digestão. Desta forma, os resultados apontam no sentido de, em ambas as infusões, não existir qualquer alteração ao nível dos compostos responsáveis por este sequestro após a digestão *in vitro*.

Conclusão

Nos últimos anos têm-se intensificado os estudos em alimentos de origem vegetal, com vista a comprovar as propriedades benéficas para a saúde que lhes estão associadas, bem como a identificar quais os compostos neles presentes responsáveis por essas mesmas propriedades benéficas. Neste contexto, as infusões de plantas medicinais têm sido alvo de investigação científica, de modo a comprovar e relacionar a presença de compostos bioactivos com a promoção da saúde, mais propriamente com as suas propriedades antioxidantes, antimutagénicas, antimicrobianas, entre outras. Contudo, a maioria destes estudos, baseia-se em ensaios *in vitro*, e, deste modo, levanta-se a questão de saber até que ponto é que as propriedades detectadas *in vitro* se mantêm *in vivo*. Com efeito, o facto de um composto apresentar uma determinada actividade *in vitro* não é condição necessária e suficiente para que a mantenha nas condições fisiológicas. Uma das condições que tem de se verificar para que tal aconteça é que esse composto resista ao processo de digestão gastrointestinal.

Assim, o principal objectivo deste trabalho foi o de avaliar se as propriedades antioxidantes das infusões de tília e cidreira se mantinham após a simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal. A escolha destas duas plantas prendeu-se com o facto de tanto as infusões de tília como as de cidreira serem de consumo corrente em Portugal.

As infusões foram sujeitas a uma simulação *in vitro* da digestão gastrointestinal, recorrendo-se à utilização de enzimas digestivas e respeitando as condições de pH presentes em cada fase da digestão. Posteriormente, efectuou-se o doseamento dos fenóis e flavonóides na amostras antes e após digestão *in vitro*. Este doseamento foi efectuado devido a ser conhecida a importância da presença dos compostos fenólicos e, em particular dos flavonóides, nas propriedades antioxidantes das infusões. Para a determinação das propriedades antioxidantes das infusões em estudo recorreu-se a diversos ensaios, de forma a abranger vários mecanismos de acção antioxidante. Assim, foram elaborados ensaios de avaliação da capacidade de sequestro de duas das principais espécies reactivas de oxigénio que podem ser geradas *in vivo*, (radical hidroxilo e radical anião superóxido), de avaliação da capacidade redutora (ensaio CUPRAC) e de capacidade de quelação de Fe(II).

Os resultados mostraram que ambas as infusões apresentaram actividade antioxidante em todos os ensaios efectuados, destacando-se a infusão de tília na capacidade de quelação de Fe(II) e a de cidreira em todas as restantes actividades. Uma vez que a infusão de tília apresentou um teor em flavonóides mais elevado do que a infusão de cidreira, mas um teor em fenóis totais inferior, estes resultados sugerem, que no conjunto dos compostos fenólicos, sejam os flavonóides aqueles que mais contribuem para a quelação de ferro, sendo, no entanto os que menos contribuem para as restantes actividades antioxidantes determinadas. Contudo, não se

pode descartar a hipótese dos flavonóides presentes em ambas as infusões serem diferentes, sendo os que se encontram presentes na infusão de cidreira bastante mais activos em termos de capacidade redutora e de sequestro de ROS.

Não foi possível avaliar o efeito da digestão gastrointestinal em dois dos ensaios efectuados devido à grande interferência verificada pela presença das enzimas digestivas. Assim, não foi possível avaliar o efeito da digestão sobre a capacidade de sequestro do radical hidroxilo nem sobre a capacidade de quelação de ferro.

Os resultados mostraram que as infusões de cidreira e tília continuam a apresentar propriedades antioxidantes após a digestão *in vitro*. A simulação do processo digestivo não teve qualquer efeito sobre a actividade de sequestro do radical anião superóxido, levando, contudo, a uma diminuição da actividade antioxidante detectada pelo ensaio CUPRAC. Esta redução foi de cerca de 9%, no caso da infusão de cidreira, e de cerca de 24%, no caso da infusão de tília. A actividade CUPRAC tem vindo a ser associada aos compostos fenólicos presentes nas amostras. Desta forma, faz sentido que a amostra que teve uma perda de fenóis e de flavonóides mais acentuada durante a simulação da digestão, ou seja, a infusão de tília, seja, igualmente aquela que apresenta a maior quebra do valor de CUPRAC. No caso da infusão de cidreira, apesar da simulação da digestão não ter provocado nenhuma alteração no teor em fenóis e em flavonóides, registou-se uma quebra de cerca de 9% na actividade CUPRAC. Este resultado pode significar a existência na amostra de outros compostos, que não os fenóis, que não resistam ao processo de digestão e que também apresentem capacidade redutora.

Os resultados obtidos permitem, assim, concluir que, apesar das diferenças observadas antes e após a simulação da digestão gastrointestinal, de uma maneira geral, a maioria dos compostos responsáveis pelo potencial antioxidante das infusões de tília e de cidreira não perde a sua actividade durante o processo digestivo.

A fim de efectuar uma associação mais precisa entre as propriedades antioxidantes das infusões estudadas e os compostos nelas presentes, responsáveis por estas mesmas propriedades, bem como sobre o impacte da simulação da digestão gastrointestinal sobre as infusões de tília e de cidreira seria de todo o interesse analisar o perfil em compostos fenólicos presentes, bem como identificar e quantificar outros compostos isolados, tais como as vitaminas. Desta forma, seria possível estudar estes compostos isoladamente e realizar uma melhor identificação dos principais compostos bioactivos presentes nas infusões e da forma como cada um deles é afectado pela digestão gastrointestinal.

Os resultados obtidos são relevantes para o conhecimento científico, no entanto são apenas uma pequena parte daquilo que é necessário estudar para se poder efectuar uma extrapolação dos resultados *in vitro* para a situação *in vivo*. Assim, o passo seguinte deveria passar pelo estudo da absorção dos compostos bioactivos destas infusões por parte das células intestinais (através de cultura de células do intestino), bem como pelo estudo da metabolização

destes compostos quer pela flora intestinal, quer pelas enzimas de biotransformação humanas. Contudo, mesmo não sendo absorvidos, a existência de compostos antioxidantes, que mantêm esta sua actividade biológica após a digestão gastrointestinal, pode ser benéfica na desactivação de espécies oxidativas que se encontrem ou se formem ao longo do tubo digestivo, impedindo, desta forma, que elas possam vir a exercer os seus efeitos deletérios.

Bibliografia

- Alarcon, E., Campos, A.M., Edwards, A.M., Lissi, E., Lopez-Alarcon, C. (2008). Antioxidant capacity of herbal infusions and tea extracts: A comparison of ORAC-fluorescein and ORAC-pyrogallol red methodologies. *Food Chemistry*, **107**(3), 1114-1119.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Albayrak, S. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices in turkey. *Journal of Food Biochemistry*, **36**(5), 547–554.
- Al-Gubory, K., Fowler, P., Garrel, C. (2010). The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42**: 1634-1650.
- Almeida M.D.V., Afonso C.I.P.N. (1997). Princípios básicos de alimentação e nutrição. Universidade Aberta, Lisboa, Portugal.
- Angelo, P., Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, **66**, 1-9.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(26), 7970-7981.
- Arias, L. (2005). Avaliação da actividade antioxidante *in vitro* de extractos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). Tese de mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Atoui, A., Mansouri, A., Boskou, G., Kefala, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**: 27-3
- Bandarra N.M., Calhau A., Nunes M.L., Oliveira L., Batista I., (2004). Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal. *Publicações Avulsas do IPIMAR* (Lisboa), 11.
- Bento, O. (2008). Alimentos funcionais – Um Mercado em expansão?. Acedido em 5 de Junho de 2012 no Web site da Universidade de Évora: http://www.dzoo.uevora.pt/index.php/dzoo/investigacao/apresentacoes/alimentos_funcionais_um_mercado_em_expansao.
- Benzie, I., Wachtel, S. (2011). Herbal medicine – biomolecular and clinical aspects. 2nd edition, CRC Press. New York.

- Buricová, L., Réblová, Z. (2008). Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech Journal of Food Science*, **26**, 132-138.
- Buonocore, G., Perrone, S., Tataranno, M. L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, **15**(4), 186-190.
- Bylka, W., Matlawska, I. & Frański, R. (2010). Essential oil composition of *Taraxacum*
- Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **72**: 301-305
- Carvalho, N., Frydberg, M., Leffa, D., Moreira, J., Nicolau, V., Amaral, P., Rossatto, A., Andrade, V. (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. *Genetics and Molecular Biology*, **34**(2), 290-297.
- Chobot, V. (2010). Simultaneous Detection of Pro- and Antioxidative Effects in the Variants of the Deoxyribose Degradation Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(4), 2088-2094.
- Cohen J.T., Bellinger D.C., Connor W.E., Shaywitz B.A., (2005). A Quantitative Analysis of Prenatal Intake of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cognitive Development. *American Journal of Preventive Medicine*, **29**(4), 366–374.
- Connor W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease, *American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 171S-175S.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D. Milzani, A. (2006) Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, **52**(4), 601–623.
- Dastmalchi, K., Dorman, H., Oinonen, P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT - Food Science and Technology*, **41**, 391-400.
- De Mejia, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., Ramirez-Mares, M. (2010). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of colon cancer cell proliferation. *Journal of Functional Foods*, **2**(1), 23-34.
- Duarte MPAC (2008) Desenvolvimento de novos sistemas de *Escherichia coli* competentes em biotransformação humana: Aplicação no estudo da metabolização de xenobióticos mediada pelos citocromos P450. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

- Espin, J.C., Garcia-Conesa, M.T., Francisco A., Tomás-Barberán, F.A. (2007). Nutraceuticals: Facts and fiction. *Phytochemistry*, **68**, 2986–3008.
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, **475**, 89-111.
- Ferreira, I., Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, **2**, 32-39.
- Ferrua, M., Singh, R. (2010). Modeling the fluid Dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion. *Journal of Food Science*, **75**(7), R151–R162.
- Gaspar, J., Silva, I.D., Laires, A., Rodrigues, A., Costa, S., Rueff, J. (1996). Prooxidant activities of flavonols: a structure activity study, in: Kumpulainen e Salonen (Edts.), *Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido, 290-297.
- Gargouri, Y., Moreau, H., Pieroni, G., Verger, R. (1988). Human gastric lipase: a sulphidryl enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, **5**, 2159-2162.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., Yilmaz, I. (2005) Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, **1**(1), 27-31.
- Gião, M., Gomes, S., Madureira, A., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M., Azevedo, I., Malcata, F. (2012). Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja Montana*. *Food Chemistry*, **131**, 761-767.
- Gropper, S., Smith, J., Groff, J. (2005). *Advance nutrition and human metabolism*. 5ª edição, Wadsworth, Cengage Learning. Belmont.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., & Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, **33**(7), 601-617
- Heinrich, H., Gabbe, E., Brüggemann, J., Ieagié, F. (1979). Enteropancreatic circulation of trypsin in man. *Klinische Wochenschrift.*, **57**, 1295-1297.
- Herodez, S., Hadolin, M., Skerget, M., Knez, Z. (2003). Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*, **80**, 275-282.

- Hollman, P., Katan, M. (1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 937-942.
- Holst, B., Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**, 73-82.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53(6)**, 1841-1856.
- Hur, S., Lim, B., Decker, E., McClements, D. (2011). *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, **125**, 1-12.
- Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**, 620-650.
- Kohlmeier, M. (2003). Nutrient metabolism. Academic Press, San Diego, California, EUA.
- Koşar, M., Göger, F., Başer, K.H.C. (2008). *In Vitro* Antioxidant Properties and Phenolic Composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2369-2374.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F. Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, **113 (9B)**, 71S-88B.
- Lianda, R.L.P., Castro, R.N. (2008). Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*, **31(6)**, 1472-1475
- Lima, A.R., Pereira, R.G.F.A., Abrahão, S.A. (2010). Compostos bioativos do café: Actividade antioxidante *in vitro* do café verde e torrado antes e após descafeinação. *Química Nova*, **33(1)**, 20-24.
- Limón-Pacheco, J., Gonsébat, M. (2009). The role of antioxidants and antioxidants-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **674**, 137-147.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **613(1)**, 1-19.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81(suppl)**, 230S-242S.
- Marrassini, C., Anesini, C., Ferrano, G. (2011). HPLC fingerprint of a flower extract of *Tilia x viridis* and correlation with antiproliferative and antioxidant activity. *Phytotherapy research*, **25**, 1466-1471.
- Matsumoto, R. (2008). Atividade antioxidante de chá mate (*Ilex paraguariensis*). Tese de mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C., Aquino, R. (2007). Triterpene, Antioxidante, and Antimicrobial Compounds from *Melissa officinalis*. *Journal of Natural Products*, **70**: 1889-1894.
- Moraes, F., Colla, L. (2006). Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, **3(2)**, 109-122.
- Nakamura, S., Kato, A., Kobayashi, K. (1992). Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40(11)**, 2033-2037.
- Olson, R.E. (2003). Disorders of Nutrition and Metabolism. In: Beers, M.H. (Ed) *The Merck Manual of Medical Information*. 2ª Edição. New York, Merck & Co., Inc. pp 890-912.
- Pereira, R., Fachineto, R., Prestes, A., Puntel, R., Silva, G., Heinzmann, B., Boschetti, T., Athayde, M., Bürger, M., Morel, A., Morsch, V., Rocha, J. (2009). Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochemical Research*, **34**, 973-983.
- Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A.G., Marcuzzan, G.L., Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemical Analysis*, **15(4)**, 235-240.
- Porfírio, S., Falé, P., Madeira, P., Florêncio, M., Ascensão, L., Serralheiro, M. (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, **122**, 179-18

- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290-4302.
- Record, I., Lane, J. (2001). Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chemistry*, **73**, 481-486.
- Ribeiro S.M.R., Queiroz J.H., Pelúzo M.C. G., Costa N.M.B., Matta S.L.P., Queiroz M. E.L.R., (2005). A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, **21**(3), 133-149.
- Rothman, S., Liebowm C., Isenman, L. (2002). Conservation of digestive enzymes. *Physiological Reviews*, **82**(1), 1-18.
- SanGiovanni J.P., Chew E.Y., Clemons T.E., Davis M.D., Ferris III F.L., Gensler G.R., Kurinij N., Lindblad A.S., Milton R.C., Seddon J.M.; Sperduto R.D. (2007). The Relationship of Dietary Lipid Intake and Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study. *Archives of Ophthalmology*, **125**, 671-679.
- Seeley, R., Stephens, T., Tate, P. (2005). *Anatomia & Fisiologia*. 6ª Edição, Lusociência. Loures.
- Seddon J.M., George S., Rosner B. (2006) Cigarette Smoking, Fish Consumption, Omega-3 Fatty Acid Intake, and Associations With Age-Related Macular Degeneration The US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology*, **124**, 995-1001.
- Serafini, M. (2006). The role of antioxidants in disease prevention. *Medicine*, 34(12), 533-535.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, **299** 152-178.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., Ruberto, G. (2011). Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 12453-12459.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry*, **11**(9), 1105-1112.

- Toker, G., Küpeli, E., Memisoglu, M., Yesilada, E. (2004). Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of Ethnopharmacology*, **95**, 393-397.
- Valdemarra, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, **165**, 36-46.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2001). Antioxidant Activity of Centaurium erythraea Infusion Evidenced by Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**(7), 3476-3479.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**, 44–84.
- Williamson, G., Manach, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies *The American Journal of Clinical Nutrition*, **81** (suppl), 243S–245S.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A., Algur, O., Bilaloglu, V. (2000). Comparison of antioxidants and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea* Desf Ex DC), Sage (*Salvia triloba* L.) and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 5030-5034.

Portais da Internet

<http://www.dj003.k12.sd.us>, acessado em Agosto de 2012

<http://www.eufic.org/article/pt/nutricao/alimentos-funcionais/expid/6/>, acessado em Agosto de 2012.

<http://www.jardimplantasmedicinais.com>, acessado em Agosto de 2012.

<http://www.plantasmedicinaisefitoterapia.com>, acessado em Agosto de 2012.

<http://www.umm.edu>, acessado em Agosto de 2012.